



# Etude des protéines à motif PQ : Identification d'un nouveau transporteur lysosomal impliqué dans le traitement de la cystinose et analyse bioinformatique de la famille protéique

Adrien Jézégou

## ► To cite this version:

Adrien Jézégou. Etude des protéines à motif PQ : Identification d'un nouveau transporteur lysosomal impliqué dans le traitement de la cystinose et analyse bioinformatique de la famille protéique. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T076 . tel-01233938

**HAL Id: tel-01233938**

**<https://theses.hal.science/tel-01233938>**

Submitted on 26 Nov 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

**THÈSE DE DOCTORAT**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris-Sud

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Ecole Doctorale 419

« Signalisations et réseaux intégratifs en Biologie, Bio-SigNE »

Présentée et soutenue publiquement par

**Adrien JEZEGOU**

Le 25 novembre 2014

Laboratoire de dynamique membranaires

CNRS UMR 8192

**Etude des protéines à motif PQ:**Identification d'un nouveau transporteur lysosomal impliqué dans le traitement de la cystinose  
et

Analyse bioinformatique de la famille protéique

Directeur de thèse: Mr Bruno Gasnier

DR2 CNRS (Université Paris Descartes)

**JURY**

Président du jury: Mr Marc le Maire

PU CEA/CNRS (Université Paris-Sud)

Rapporteurs: Mr Bruno Miroux

DR2 INSERM (Institut de Biologie Physico Chimique)

Mr Roland Salesse

DR1 INRA (Université Paris-Sud)

Examineurs: Mr Salah El Mestikawy

DR1 CNRS (Université Pierre et Marie Curie)

Mme Vasiliki Kalatzis

CR1 INSERM (Institut des Neurosciences de Montpellier)



# Table des matières

<b>I-Introduction .....</b>	<b>1</b>
0 - Préambule .....	1
1 - Transporteurs secondaires actifs, généralités .....	2
1.1 - Mode de classification des transporteurs .....	3
1.2 - Classification architecturale des transporteurs secondaires actifs .....	4
1.3 - Rôles cellulaires des transporteurs secondaires .....	15
1.4 - Régulation des transporteurs secondaires .....	16
2 - Sujet d'étude de la thèse.....	17
3 - Les protéines à motif PQ et leurs dysfonctions chez l'homme .....	19
3.1 - Définition du motif PQ .....	19
3.2 - Connaissances actuelles sur les protéines à motif PQ.....	21
 <b>II – Résultats .....</b>	 <b>39</b>
<b>Chapitre 1: Identification et caractérisation de la protéine PQLC2 et de ses orthologues de levure .....</b>	<b>39</b>
1 - Identification et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle protéine membranaire lysosomale .....	41
1.1 - PQLC2 est localisé à la membrane lysosomale.....	41
1.2 - L'étude des orthologues de levure de PQLC2 suggère un rôle dans l'homéostasie des acides aminés basiques .....	46
1.3 - Test de l'hypothèse des levuristes et caractérisation de la fonction de transport de PQLC2.....	49
 2 – Conservation de la fonction chez la levure et origine du phénotype canavanine » .....	 63

2.1 - Orthologie entre Ypq2 et PQLC2.....	63
2.2 - Explication du phénotype « canavanine » .....	65
3 – Rôle de PQLC2 dans la pharmacothérapie de la cystinose .....	69
3.1 - Identité de PQLC2 avec le système c .....	70
3.2 - PQLC2 transporte le disulfure mixte.....	71
3.3 - Rôle de PQLC2 dans l'effet thérapeutique de la cystéamine .....	73

## **Chapitre 2: Analyse bioinformatique des asymétries des protéines à motif PQ ..... 81**

1 - Introduction .....	81
1.1 - La famille à motif PQ: topologie et motif consensus.....	81
1.2 - Rôle de la pseudo-symétrie et de l'asymétrie dans les transporteurs secondaires.....	84
1.3 - Etude antérieure sur les asymétries des transporteurs mitochondriaux.....	85
1.4 - Transposition de ce type d'étude aux protéines à motif PQ .....	87
1.5 – Asymétrie du résidu D305 de la cystinosine .....	87
2 - Préparation de l'analyse .....	88
2.1 – Obtention et tri des séquences.....	89
2.2 - Alignement des ensembles cystinosine, PQLC2 et MPU1.....	90
3 - Comparaison de séquence (asymétrie, conservation) avec la matrice de Cserzo et analyse des résultats .....	95
3.1 - Définitions préalables: asymétrie et conservation .....	95
3.2 - Matrice de Cserzo .....	97
3.3 - Résultats .....	99
3.4 - Analyse des asymétries .....	100
3.5 - Matrice de Cserzo : Bilan .....	107

4 – Comparaison de séquence (asymétrie, conservation) avec une matrice "biochimique" et analyse des résultats .....	108
4.1 - Elaboration de la matrice .....	108
4.2 - Attribution d'un facteur correctif aux résultats d'asymétrie .....	109
4.3 - Résultats .....	110
4.4 - Analyse des asymétries .....	112
 <b>III - Discussion / Perspectives .....</b>	<b>123</b>
<b>IV - Matériels et méthodes .....</b>	<b>141</b>
<b>V- Références .....</b>	<b>145</b>
<b>VI- Remerciements.....</b>	<b>153</b>
<b>VII- Article: Jézégou et coll. PNAS 2012 .....</b>	<b>155</b>



# Table des figures

Figure 1. Modèle topologique et structure cristalline de l'architecture MFS .....	5
Figure 2. Modèle topologique et structure cristalline de l'architecture LeuT .....	7
Figure 3. Modèle topologique et structure cristalline de l'architecture NhaA.....	8
Figure 4. Modèle topologique et structure cristalline de l'architecture GltPh.....	9
Figure 5. Modèle topologique et structure cristalline de l'architecture EmrE.....	10
Figure 6. Modèle topologique et structure cristalline de l'architecture AcrB .....	12
Figure 7. Modèle topologique et structure cristalline de l'architecture BtAAC.....	13
Figure 8. Modèle topologique et structure cristalline de l'architecture ClC .....	14
Figure 9. Alignement des séquences intra et inter protéiques dans la famille des protéines à motif PQ .....	20
Figure 10. Dendogramme de l'ensemble des protéines à motif PQ humaines et de levure.....	21
Figure 11. Symptôme oculaire de la cystinose et effet du traitement par la cystéamine.....	24
Figure 12. Tableau des symptômes associés à la cystinose, avec leur âge moyen d'apparition et leur prévalence.....	25
Figure 13. Schéma illustratif du mécanisme d'action supposé du traitement de la cystinose par la cystéamine.....	32
Figure 14. Réaction chimique du traitement de la cystinose par la cystéamine et similarité de structure entre le produit de réaction et la lysine, acide aminé basique .....	32
Figure 15. Schéma des étapes de N-glycosylation dans le réticulum endoplasmique .....	34
Figure16. Déconvolution des acquisitions en épifluorescence d'une cellule Hela exprimant la protéine rPQLC2 fusionnée à l'EGFP et immunomarquage du marqueur lysosomal LAMP-1 .....	43
Figure 17. Acquisitions en épifluorescence d'une cellule Hela exprimant la protéine rPQLC2 fusionnée à l'EGFP mutée sur son motif d'adressage et immunomarquage du marqueur lysosomal LAMP-1 .....	45



Figure 18. Acquisitions en épifluorescence de levures exprimant les protéines YPQ 1 à 3, étiquetté par l'EGFP et coloration de la vacuole par le FM4-64 .....	47
Figure 19. Chargement à pH5 en lysine radiomarquée des cellules HEK-293, transfectées par l'EGFP, PQLC2 sauvage ou adressé à la membrane plasmique de la cellule.....	52
Figure 20. Acquisitions en épifluorescence des ovocytes injectés avec de l'eau ou l'ARNc de l'EGFP, de PQLC2 sauvage ou muté sur le motif d'adressage LL/AA, tous deux étiquetés par l'EGFP .....	54
Figure 21. Test du transport par PQLC2 des acides aminés basiques radiomarqués dans les ovocytes de Xénopes.....	55
Figure 22. Test du transport au cours du temps de l'arginine radiomarquée sur des ovocytes PQLC2-LL/AA-EGFP ou sans expression exogène.....	56
Figure 23. Dépendance au pH du transport de l'arginine par PQLC2 en mesures biochimiques ..	56
Figure 24. Courbe dose-réponse du transporteur par l'approche de traceur de flux radioactif en représentation Michaelis-Menten ou Eadie-Hofstee.....	57
Figure 25. Transport résiduel de l'arginine radiomarquée après compétition avec chaque acide aminé. ....	57
Figure 26. Acides aminés basiques à pH5 .....	58
Figure 27. Test électrophysiologique du courant évoqué par différents acides aminés à 10mM dans un milieu extracellulaire à pH5 sur des ovocytes PQLC2-LL/AA et non injectés clampés à -40mV.....	60
Figure 28. Histogramme de la moyenne de l'ensemble des mesures électrophysiologiques .....	61
Figure 29. Caractérisation électrophysiologique de la courbe dose-réponse du transporteur en représentation Michaelis-Menten ou Eadie-Hofstee.....	62
Figure 30. Dépendance au pH du transport de l'arginine par PQLC2 en mesures électrophysiologiques.....	62
Figure 31. Expression de PQLC2 étiqueté avec la protéine EGFP dans les levures. Test de complémentation fonctionnelle d'YPQ2 par PQLC2.....	65
Figure 32. Juxtaposition des courants évoqués par l'arginine ou par la canavanine dans des ovocytes PQLC2-LL/AA à différentes concentrations, pH5 .....	67

Figure 33. Schéma des apports et cheminements du composé naturel ou toxique déterminant le ratio canavanine/arginine dans le cytosol.....	68
Figure 34. Capacité du MxD à accélérer l'efflux lysosomal de lysine préchargée dans les lysosomes.....	69
Figure 35. Transport résiduel de PQLC2 ou CAT1 à la surface de l'ovocyte, d'arginine radiomarquée après compétition avec 10mM d'arginine froide ou des composés méthylés qui discriminent le système y+ (CAT1) du système c .....	71
Figure 36. Transport résiduel d'arginine radiomarquée après compétition avec 10mM de disulfure mixte ou bien d'acides aminés basiques froids dans des ovocytes exprimant PQLC2.....	72
Figure 37. Test électrophysiologique du transport du disulfure mixte en comparaison avec celui de l'arginine à 10mM en milieu extracellulaire acide, sur le même ovocyte PQLC2-LL/AA .....	72
Figure 38. Représentation Eadie-Hofstee de l'ensemble des ovocytes testés électrophysiologiquement pour le transport de l'arginine et pour le disulfure mixte à des concentrations extracellulaires différentes à pH5.....	73
Figure 39. Schéma explicatif du test de quantification du MxD après silencing de PQLC2 sur des fibroblastes de patients cystinotiques traités à la cystéamine. ....	74
Figure 40. Quantification par qRT-PCR des ARNm de PQLC2 après transfections de fibroblastes "normaux" avec les siRNA anti-PQLC2.....	75
Figure 41. Schéma explicatif du mécanisme de charge des lysosomes en [3H]Lys par l'intermédiaire de la lysine estérifiée radiomarquée [3H]LysOMe.....	76
Figure 42. Chromatographie sur couche mince des extraits cellulaires de fibroblastes "normaux" après 2h d'incubation avec la lysine estérifiée radiomarquée ([3H]LysOMe).....	77
Figure 43. Chromatographie sur couche mince des extraits cellulaires de fibroblastes "normaux" traités au siRNA anti PQLC2 pendant 4 jours et incubé pendant deux heures dans la lysine estérifiée radiomarquée .....	78
Figure 44. Analyse par spectrométrie de masse du taux de cystine dans les cellules "normales" ou cystinotiques , traitées ou non à la cystéamine .....	79
Figure 45. Analyse par spectrométrie de masse du taux de disulfure mixte (MxD) dans les cellules "normales" (a gauche) ou cystinotiques , traitées ou non à la cystéamine .....	80
Figure 46. Topologie générale des protéines à motif PQ.....	83
Figure 47. Méthode d'alignement des domaines répétés de la famille PQ.....	91

Figure 48. Etapes de l'analyse des asymétries entre domaines répétés de la famille PQ .....	96
Figure 49. Matrice de Czerzo.....	99
Figure 50. Moyenne des scores miroirs des couples de résidus pour chaque ensemble protéique selon la matrice de Czerzo .....	100
Figure 51. Représentation de la conservation des résidus, asymétriques selon la matrice de Czerzo, de PQLC2 .....	103
Figure 52. Représentation de la conservation des résidus, asymétriques selon la matrice de Czerzo, de la cystinosine.....	104
Figure 53. Représentation de la conservation des résidus, asymétriques selon la matrice de Czerzo, de MPU1.....	106
Figure 54. Matrice visant à la distinction des caractéristiques biochimiques des acides aminés	109
Figure 55. Moyenne des scores d'asymétries des résidus miroirs pour chaque ensemble protéique selon la matrice "biochimique" .....	111
Figure 56. Schéma des asymétries biochimiques des TMs1-5 miroirs des membres de la famille PQ.....	112
Figure 57. Schéma des asymétries biochimiques des TMs2-6 miroirs des membres de la famille PQ .....	114
Figure 58. Conservation des résidus asymétriques, selon la matrice biochimique, des ensembles cystinosine et PQLC2 pour la position [+29] et des trois ensembles pour la position [+32].....	116
Figure 59. Conservation des résidus asymétriques, selon la matrice "biochimique", des ensembles cystinosine et PQLC2 pour la position [+26] et des trois ensembles pour la position [+22].....	117
Figure 60. Modèle théorique du mécanisme de transport de la cystinosine et de PQLC2 .....	119
Figure 61. In situ localization of Stm1 protein.....	132
Figure 62. Résidus impliqués dans la modulation du taux d'AMPc après surexpression de la protéine Stm1, selon la publication de Chung et coll. 2001 et conservation du résidu lysine [+9]	135
Figure 63. Consensus sequences required for interaction with G proteins from several G protein-coupled receptors .....	136





# Introduction

## Préambule

La compartimentalisation cellulaire est essentielle à la survie et au bon fonctionnement des cellules eucaryotes. Ces compartiments sont le plus souvent délimités par des membranes biologiques, qui ont une composition sélective et assurent les différences de composition de part et d'autre de la membrane. Les processus responsables de cette différenciation sont, d'une part, l'acheminement sélectif des protéines par des mécanismes de fission et fusion membranaires et, d'autre part, le passage sélectif, souvent actif, de petites molécules et d'ions inorganiques à travers les membranes (Bonifacino et coll. Cell 2004, Dubyak AdvPhysiolEduc 2004). Dans certains cas (mitochondries, autophagie médiée par des chaperons), des macromolécules déjà synthétisées peuvent être dépliées et passer elles aussi à travers la membrane (Kaushik et Cuervo TrendsCellBiol 2012; Hill et coll. Nature 1998). Ces échanges dynamiques créent ainsi des conditions micro-environnementales spécifiques et favorables à chaque activité biologique de la cellule eucaryote.

L'établissement et le maintien des gradients de concentrations entre les compartiments cellulaires sont régis par des transporteurs membranaires actifs qui transloquent leurs substrats contre un gradient de concentration. Ces protéines utilisent, pour les transporteurs primaires, une source d'énergie non

« vectorielle » telle que l'ATP, la lumière, les électrons, et pour les transporteurs secondaires, le gradient électrochimique d'ion inorganique généré par un transporteur primaire grâce au couplage du transport du substrat avec les ions primaires.

A titre d'exemple, la V-ATPase, transporteur primaire du lysosome, transloque les protons du cytosol vers la lumière lysosomale en utilisant l'hydrolyse de l'ATP. Elle acidifie ainsi le lysosome et crée un gradient de proton membranaire sortant (Mindell AnnuRevPhysiol 2012).

L'acidité de la lumière active les enzymes lysosomales et le gradient de protons active l'efflux des produits d'hydrolyse par les transporteurs secondaires du lysosome. Ma thèse porte sur cette dernière catégorie de protéines.

## 1 - Transporteurs secondaires actifs, généralités

Le rôle des transporteurs secondaires est le passage d'un compartiment à un autre de substrats spécifiques, souvent couplés au passage d'ions primaires en antiport ou symport afin d'assurer le maintien de l'homéostasie dans les cellules. Cette action se produit contre le gradient de concentration et nécessite donc un système adapté pour orienter le transport du substrat. Au contraire, dans le cas des canaux ioniques, qui ouvrent un pore hydrophile communiquant entre deux compartiments, le flux net s'oriente en fonction des différences de concentrations de part et d'autre de la membrane et, si les espèces transportées sont chargées, du potentiel électrique transmembranaire. Ces espèces diffusent donc passivement selon leur gradient de concentration électrochimique.

Pour empêcher la communication directe entre compartiments, synonyme de diffusion passive, les transporteurs secondaires effectuent des cycles de transport selon un mécanisme baptisé « accès alterné », qui se définit par des changements séquentiels d'états conformationnels n'autorisant l'accès du substrat que d'un seul côté de la membrane à la fois. La cinétique de transport présente ainsi le désavantage d'être plus lente que celle des canaux ioniques (car le passage de chaque molécule est étroitement lié aux changements de conformation) mais, en contrepartie, ce mécanisme permet d'avoir un transport sélectif et orienté en fonction des besoins de la cellule plutôt que par les contraintes physico-chimiques de leur environnement (Gadsby NatRevMolCellBiol 2009).

### 1.1 - Mode de classification des transporteurs

La classification des transporteurs a dans un premier temps été établie grâce à l'accès aux structures primaires des transporteurs pour être ensuite modifiée par la connaissance assez récente de leurs structures tertiaires.

La structure primaire a permis de regrouper, par alignement de séquence, les transporteurs partageant de fortes homologies de séquences en familles ou bien en superfamilles. La structure tertiaire de ces protéines a été déterminée pour la première fois en 2003 avec la caractérisation structurale de l'échangeur ADP/ATP mitochondrial, du transporteur de glycerol-3-phosphate GlpT et de la perméase au lactose LacY. (Pebay-Peyroula et coll. Nature 2003; Huang et coll. Science 2003; Abramson et coll. Science 2003)

Depuis, la structure tertiaire de nombreuses familles est connue et certaines familles, bien qu'ayant des homologies très faibles, partagent une même



architecture. La classification actuelle des transporteurs tient donc compte à la fois des structures primaires et tertiaires pour définir les grands groupes de transporteurs secondaires (Forrest et coll. BiochimBiophys Acta 2011; Shi AnnuRevBiophys 2013).

## 1.2 - Classification architecturale des transporteurs secondaires actifs

### **1.2.1 - Architecture de la Major Facilitator Superfamily (MFS)**

La superfamille MFS contient environ 50% des transporteurs connus dans l'ensemble des espèces eucaryotes et procaryotes. Les membres de cette superfamille possèdent en général 12 segments transmembranaires (TMs) regroupés en deux domaines répétés N-terminal (TMs1-6) et C-terminal (TMs7-12) (figure 1 panneau A). Ces domaines pseudo-symétriques forment un angle entre eux, ce qui crée à leur interface une cavité aqueuse ouverte vers le cytosol ou vers le compartiment extracytosolique selon les structures obtenues. Le site de liaison des substrats situé au centre de la protéine, c'est-à-dire au fond de la cavité aqueuse, est ainsi exposé alternativement vers un compartiment ou l'autre. Il existe deux niveaux de symétrie dans cette structure. D'une part, une rotation de 180° selon un axe perpendiculaire à la membrane permet de superposer les domaines N- et C-terminaux. D'autre part, au sein de chaque domaine, il existe une répétition inversée topologiquement de 3TMs. Par exemple, les TMs 1 à 3 se superposent aux TMs 4 à 6 si l'on applique une rotation de 180° selon un axe présent dans le plan de la membrane. Chaque domaine forme une structure très compacte (figure 1 panneau B). Certains transporteurs possèdent des TMs

supplémentaires dont le rôle serait de stabiliser le « cœur » fonctionnel de 12TMs (Yan TrendsBiochemSci 2013). Le mode de fonctionnement de ces transporteurs peut être de type antiport, symport ou bien uniport. Les ions co-transportés sont variés (parfois absents) et les substrats organiques transportés sont aussi très divers : acides aminés, sucres, composés toxiques, etc. Ces transporteurs fonctionnent sous forme de monomère (Pao MicrobiolMolBiolRev 1998).

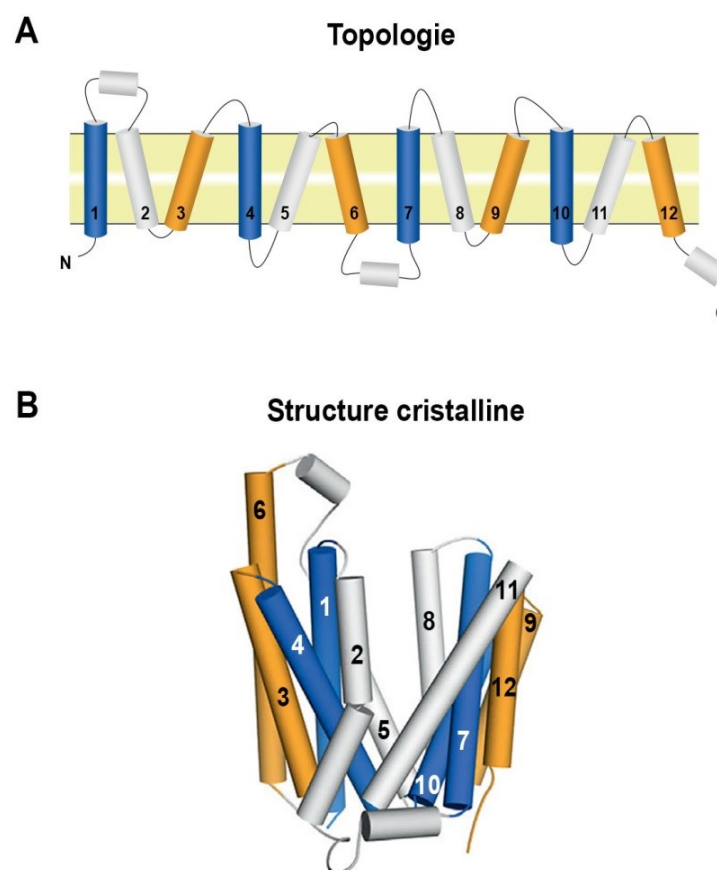


Figure 1. A) Modèle topologique de l'architecture de la Major Facilitator Superfamily. B) Représentation tridimensionnelle cylindrique de la structure cristalline de la Major Facilitator Superfamily (Yan TrendsBiochemicalSciences 2013). Les TMs de chaque sous-domaine possèdent une même colorisation en (A) et (B).

### 1.2.2 - Architecture LeuT

Ce modèle structural tient son nom du premier membre dont la structure a été élucidée. LeuT est l'homologue bactérien de la famille des symporteurs de neurotransmetteurs dépendant du sodium (famille NSS). Une architecture similaire est observée dans neuf familles ou superfamilles dont les structures primaires ne sont généralement pas apparentées. Celle-ci est organisée en dix TMs subdivisés en deux répétitions inversées topologiquement de 5TMs. Chaque premier TM de chaque répétition (TM1 et TM6) est discontinu avec deux demi-hélices alpha connectées par un segment déplié hautement conservé (figure 2). Ces régions dépliées, situées au centre de la protéine, participent à la formation du site de liaison du substrat et des ions inorganiques. Elles serviraient aussi de charnières à des mouvements des demi-hélices alpha. Ces dernières formeraient ainsi des portes cytosoliques et extracytosoliques contrôlant l'accès au site de liaison central (Forrest et coll. PNAS 2008).

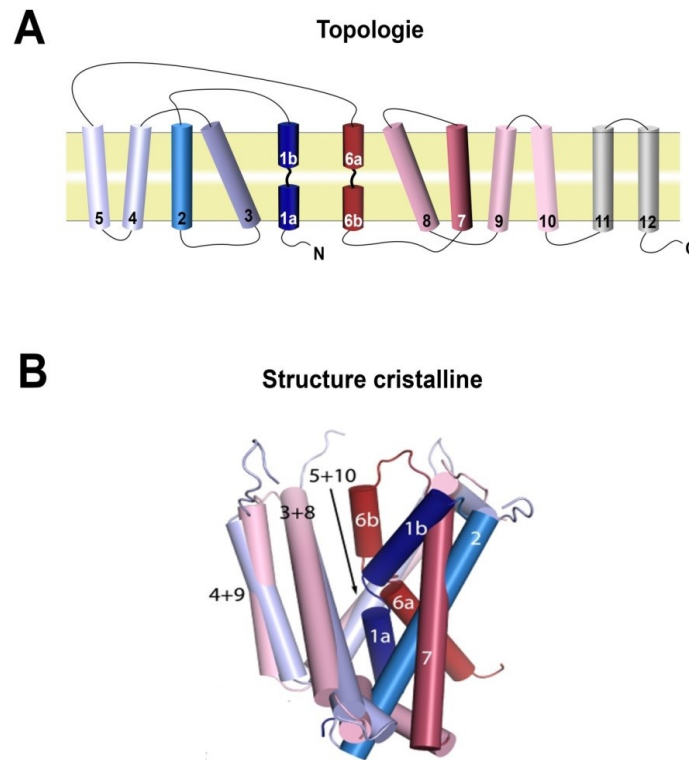


Figure 2. A) Modèle topologique du transporteur LeuT. B) Représentation de la structure cristalline en cylindre de l'architecture LeuT (Forrest et coll. PNAS 2008). La colorisation des TMs en (A) et (B) est respectée.

### 1.2.3 - Architecture NhaA

La superfamille NhaA, contient l'antiporteur sodium/proton bactérien caractérisé en premier ainsi que la famille de transporteurs apicaux d'acides biliaires dépendant du sodium (famille ASBT). Ces transporteurs sont actifs à l'état monomérique et, tout comme le modèle structural LeuT, comptent 10TMs comprenant deux répétitions inversées topologiquement de 5TMs (Schushan et coll. JBiolChem 2012). La structure s'en distingue cependant par l'existence de deux demi-hélices connectées par un segment déplié non pas aux TMs 1 et 6 mais aux TM4 et TM9. Les segments dépliés ont la particularité de se croiser au centre de

la structure protéique (TMs vert olive et rose figure 3) et plusieurs études établissent leur rôle dans la liaison aux cations transloqués (Lentes et coll. PLoS One 2014; Schushan et coll. JBiolChem 2012).

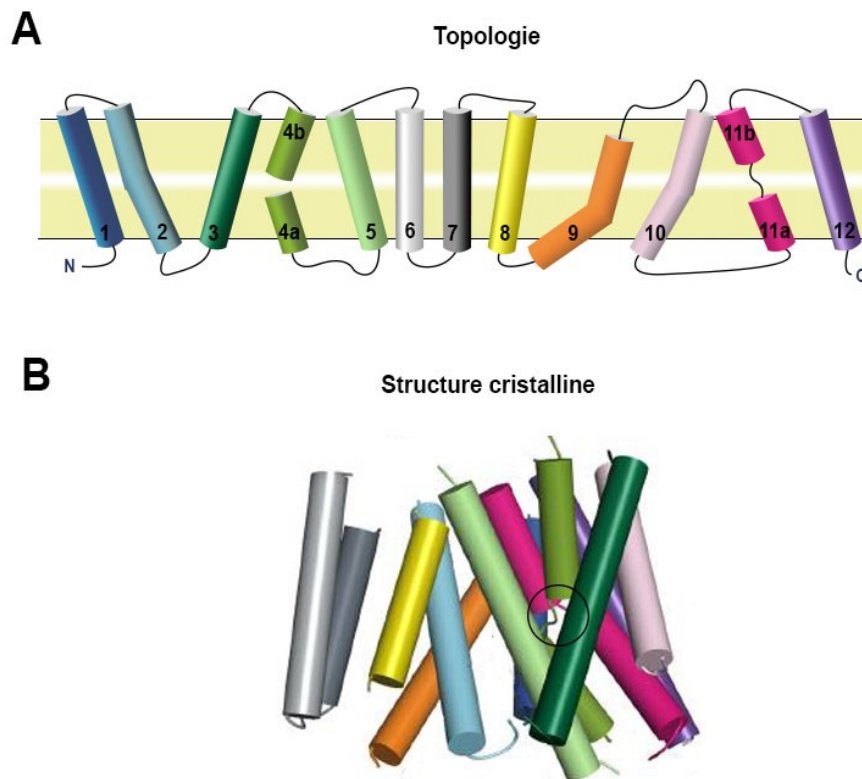


Figure 3. A) Modèle topologique de l'architecture NhaA. B) Représentation tridimensionnelle cylindrique de la structure cristalline de l'architecture NhaA en vue périphérique. Le croisement entre les structures lâches du TM4 (vert olive) et TM11 (rose) est signalé par un cercle noir (d'après Schushan et coll. JBiolChem 2011).

### 1.2.4 - Architecture Glt<sup>Ph</sup>

Cette architecture est celle de la famille des transporteurs d'acides aminés excitateurs, EAATs, caractérisée sur l'homologue bactérien Glt<sup>Ph</sup>, un symporteur

sodium/aspartate. Ces transporteurs sont actifs à l'état homotrimérique avec des protomères de huit TMs. Les protomères sont constitués de deux répétitions de trois TMs (TM1-3 ou TM4-6) topologiquement inversées suivies de deux répétitions d'un TM et d'une hélice rééminente (TM7 et HP1 ou TM8 et HP2) aux topologies inversées elles aussi (figure 4). Les études sur la structure montrent que les six premiers TMs forment un cylindre penché qui accueille un noyau compact constitué des deux HPs qui lierait le substrat du transporteur (DeChancie et coll. MolBiosyst 2011).

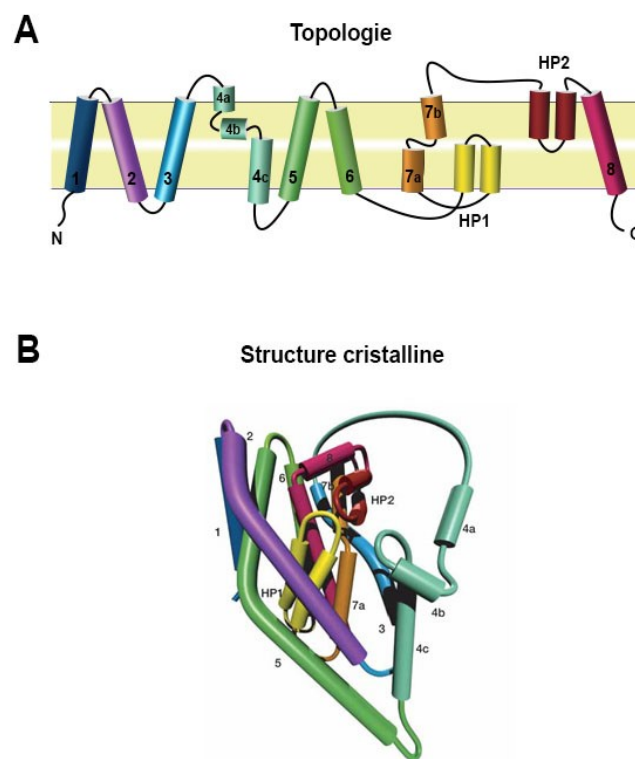


Figure 4. A) Représentation en deux dimensions de l'architecture Glt<sup>Ph</sup> B) Représentation tridimensionnelle en cylindre de la structure Glt<sup>Ph</sup> avec les deux domaines HP1 et HP2 du noyau protéique en rouge et jaune (Yernool et coll. Nature 2004).

### 1.2.5 - Architecture EmrE

Les protéines adoptant cette architecture font partie de la famille bactérienne de transporteurs "Small Multidrug Resistance Protein" (SMR) dont la structure de l'antiporteur couplé aux protons EmrE est la mieux caractérisée. Ce transporteur, responsable de l'efflux cellulaire de toxiques polyaromatiques cationiques, est constitué de seulement 4 hélices TMs et fonctionne à l'état dimérisé. Chaque protomère de la protéine fonctionnelle est symétrique à son partenaire selon une rotation de 180° par rapport à l'axe membranaire. La protéine s'insère donc dans la membrane de deux manières avec un N et C terminal du côté opposé à celui de son partenaire (Lloris-Garcera et coll. JMolBiol 2013; Chen et coll. PNAS 2007; Korkhov et Tate 2009 Acta Crystallogr DBiol Crystallogr). Il n'existe donc pas de symétrie interne aux protomères mais elle existe tout de même grâce à la multimérisation du transporteur.

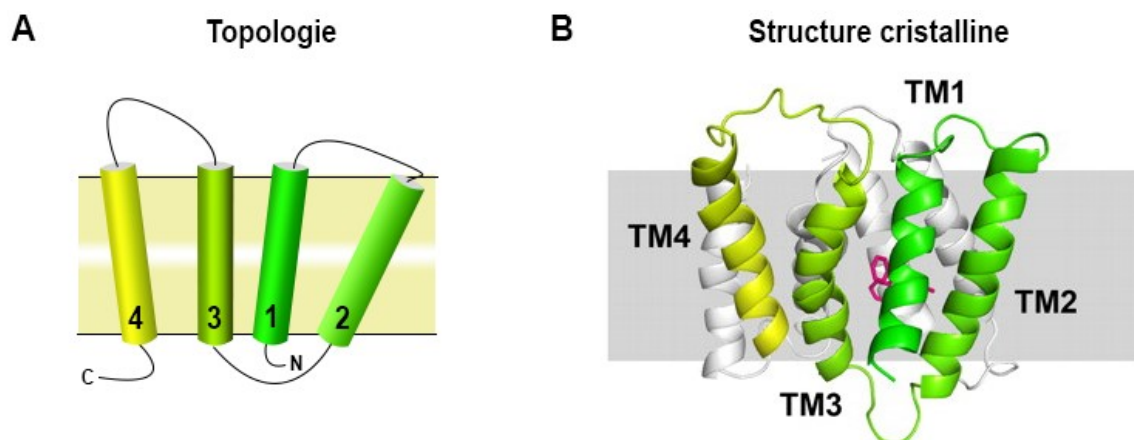


Figure 5. A) Modèle topologique du transporteur EmrE. B) Représentation tridimensionnelle du dimère actif d'EmrE en vue périphérique. Les deux protomères sont colorisés en vert ou bien en gris (Chen et coll. PNAS 2007).

### 1.2.6 - Architecture AcrB

Cette architecture se retrouve exclusivement chez les bactéries dans la famille des RND (Resistance Nodulation Cell Division), responsables de l'efflux cellulaire de substances amphiphiles nocives (détergents, sels biliaires ou antibiotiques).

AcrB correspond à la partie membranaire d'un complexe de trois protéines qui, sous forme trimérique, constitue un transporteur traversant le périplasme des bactéries GRAM négatif. Le protomère est composé de douze TMs répartis en deux domaines parallèles de six TMs (R1 et R2). Chaque domaine possède au niveau des boucles deux larges segments périplasmiques (domaines porteurs PC et PN) qui accueillent les protéines du complexe (MexA et TolC).

MexA stabilise AcrB tandis que TolC forme un canal formé d'hélices ou bien de feuillettes du périplasme jusqu'au milieu extracellulaire. Ce complexe est actif sous forme homotrimérique et a la particularité d'assurer l'efflux des molécules du cytosol ou bien du périplasme grâce à la capacité de lier les substrats dans chacun des deux compartiments cellulaires (Seeger et coll. Science 2006).



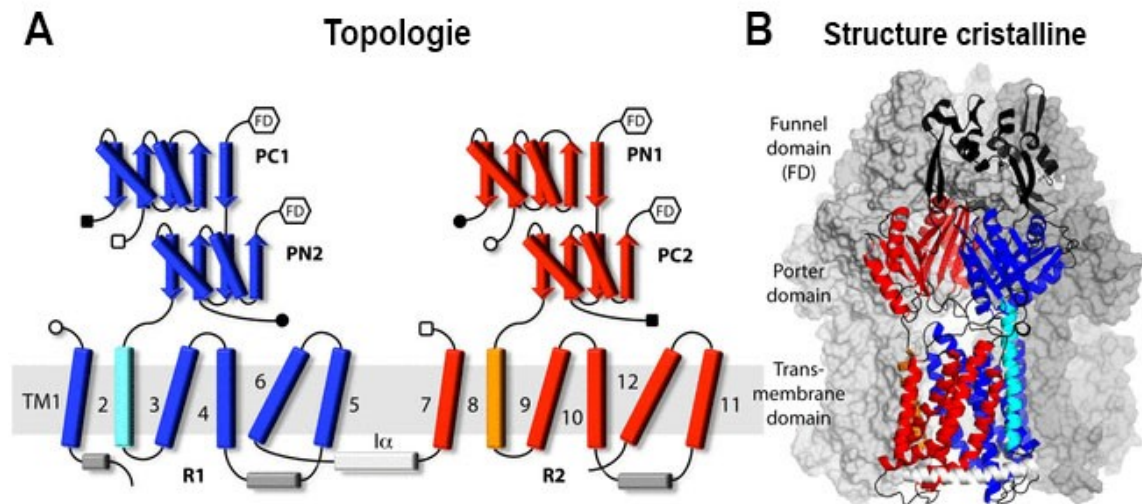


Figure 6. A) Topologie des domaines transmembranaires (R) et porteurs (PC et PN) du protomère de AcrB. Les ronds pleins/vides et carrés pleins/vides indiquent les inter-connexions entre les deux domaines répétés colorisés en rouge et bleu. B) Représentation de la structure tridimensionnelle du protomère AcrB dans la structure trimérique. Les codes couleurs sont les mêmes que pour (A) et les deux autres protomères sont colorisés en gris. (Eicher et coll. eLife 2014)

### 1.2.7 - Architecture BtAAC: transporteurs mitochondriaux

Les transporteurs mitochondriaux, dont l'échangeur ATP/ADP bovin a été le premier caractérisé structurellement (**Bos Taurus ADP/ATP carrier**), sont des protéines à 6 segments transmembranaires (Pebay-Peyroula et coll. Nature 2003). Ces transporteurs ont la particularité d'avoir une pseudo-symétrie interne parallèle avec trois domaines répétés de deux TMs ce qui les distinguent de la plupart des autres transporteurs à topologie inversées.

Ils sont situés dans la membrane interne des mitochondries et assurent l'acheminement de substrats ou de co-facteurs pour le cycle de Krebs, la  $\beta$ -oxydation des acides gras ou bien la réplication de l'ADN mitochondrial. Ils

assurent aussi l'efflux, parfois en antiport, de certains produits de réactions des processus cités.

De nombreuses études ont été menées pour connaître l'oligométrie de la forme fonctionnelle de ces transporteurs. La petite taille du protomère (6TMs semblait peu compatible avec la possibilité de transporter des substrats de moyenne taille (AA, nucléotides). Il est désormais établi que ces transporteurs fonctionnent à l'état monomérique (Kunji et Crichton *BiochimBiophysActa* 2010).

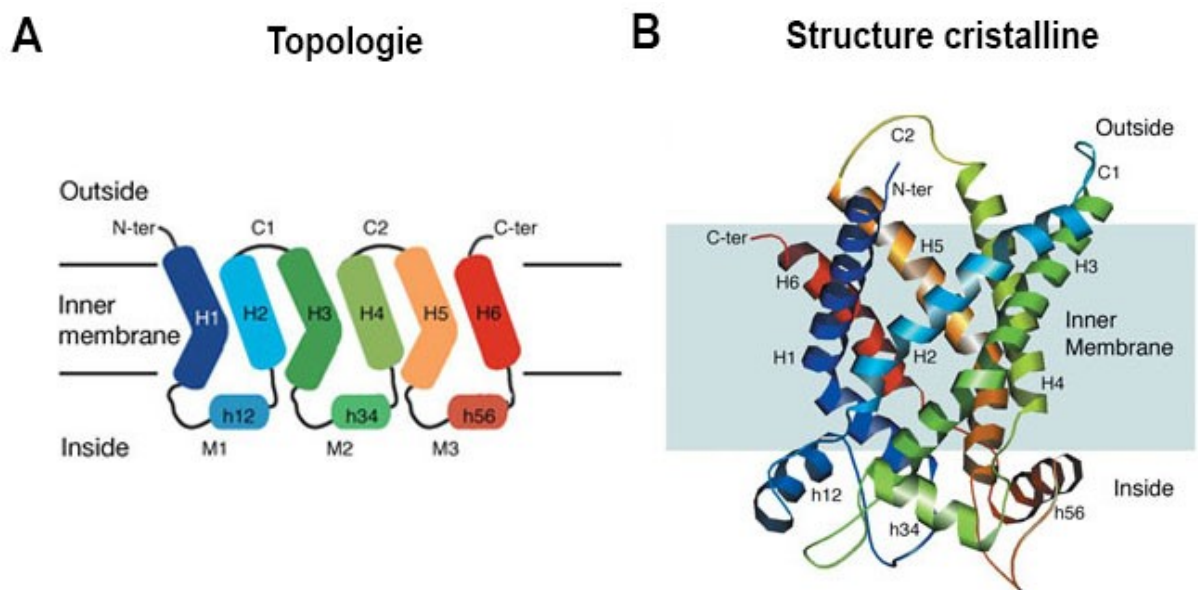


Figure 7. A) Représentation en deux dimensions de l'architecture BtAAC B) Représentation tridimensionnelle de l'architecture BtAAC. Les codes couleurs entre (A) et (B) sont respectés. (Pebay-Peyroula et coll. *Nature* 2003)

### 1.2.8 - Architecture ClC, cas particulier

La famille ClC (Chloride Carrier/Channel) est composée d'antiports  $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$  d'abord considérés comme des canaux du fait de leur cinétique rapide par rapport à un transporteur standard. La structure générale de ces protéines s'apparente à celle de canaux avec deux domaines topologiquement inversés de dix à douze TMs. Néanmoins les recherches menées sur ces protéines ont montré qu'il existait des changements conformationnels de faibles amplitudes garantissant l'occlusion des transporteurs et empêchant donc la diffusion passive (Dutzler et coll. Nature 2002). Ce transporteur n'est donc pas du même acabit que les autres transporteurs secondaires. Ceci lui confère des propriétés distinctes telle que la possibilité de fixer ses substrats simultanément et non séquentiellement ou bien d'avoir une cinétique rapide et non lente (Jayaramet coll. PNAS 2008, Miller et coll. PTRSLBBiolSci 2009).

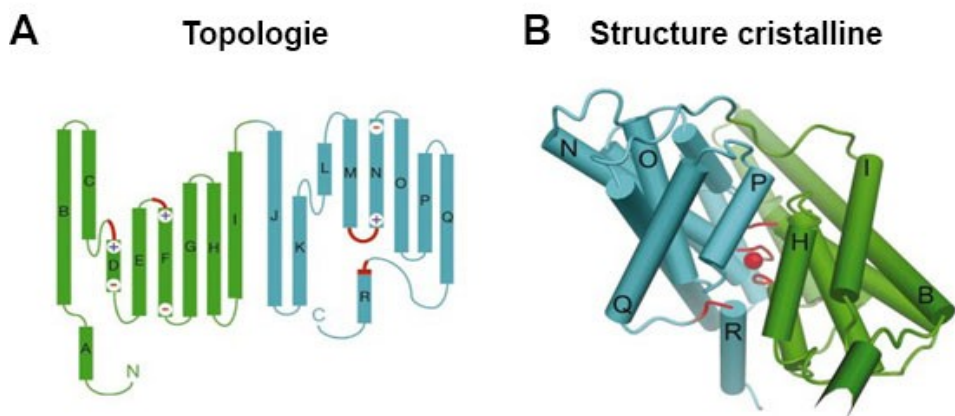


Figure 8. A) Représentation schématique de la topologie des transporteurs ClC. B) Représentation cylindrique de leur structure cristalline. Chaque domaine répété est représenté soit en vert, soit en bleu (Dutzler et coll. Nature 2002).

### 1.3 - Rôles cellulaires des transporteurs secondaires

Les transporteurs secondaires ont un rôle prédominant dans l'homéostasie cellulaire, la nutrition, l'excrétion ou la réabsorption rénale des métabolites, la résistance aux médicaments, et bien d'autres fonctions spécifiques telle que l'accumulation vésiculaire des neurotransmetteurs et leur clairance extracellulaire après leur libération. De récentes études suggèrent qu'au-delà de leur rôle dans les échanges de molécules et d'ions à travers les membranes, les transporteurs secondaires peuvent avoir une autre fonction liée à la signalisation cellulaire.

Par exemple, des études faites chez la drosophile (Ogmundsdottir et coll. PLoS One 2012) suggèrent que le transporteur lysosomal d'acides aminés LYAAT-1 (Sagné et coll. PNAS 2001) (aussi appelé PAT-1) active le complexe mTOR (mamalian target of rapamycin), une protéine kinase servant de « régulateur en chef » de la croissance, de la prolifération cellulaire et de l'autophagie. Une série de travaux récents a montré que l'activation du complexe mTOR par les acides aminés nécessite son recrutement à la surface des lysosomes et endosomes tardifs par une petite GTPase hétérodimérique de type Rag (Sancak et coll. Science 2008). D'autres travaux du même groupe suggèrent qu'une fois présent à la surface des lysosomes, le complexe mTOR est activé par les acides aminés internes du lysosome plutôt que par ceux du pool cytosolique (Zoncu et coll. Science 2011). Les éléments sous-jacents au recrutement protéique ne sont cependant pas encore totalement définis et le mécanisme d'activation par les acides aminés reste

mystérieux, mais ces données suggèrent que les transporteurs lysosomaux puissent participer à la détection des besoins nutritifs de la cellule.

#### 1.4 - Régulation des transporteurs secondaires

La régulation de l'activité des transporteurs secondaires peut se faire à un niveau transcriptionnel ou bien post-transcriptionnel.

Au niveau transcriptionnel, l'expression de certains transporteurs est induite lors de phases cellulaires précises. Par exemple, l'expression du transporteur membranaire de glucose LAT-1 est induite lors de l'activation des lymphocytes T dans la réponse immunitaire (Hayashi et coll. JImmunol 2013). Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore connus mais l'augmentation de son expression n'est pas anodine puisque le processus d'activation nécessite une forte concentration cellulaire de glucose (Marko et coll. PLOS One 2010).

Des transporteurs sont aussi surexprimés dans des cas pathologiques, souvent dans les cellules cancéreuses. C'est le cas notamment du transporteur des acides aminés basiques CAT1, situé à la membrane plasmique, qui est surexprimé dans les cellules de cancer colorectal, ce qui explique l'accumulation cytosolique d'arginine ou bien de citrulline dans la pathologie (Lu et coll. PLoS One 2013).

Au niveau post-transcriptionnel des régulations sont aussi constatées. Par exemple, la phosphorylation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cardiaque de la membrane sarcolemmale NHE1 pourrait réguler le pH cytosolique des myocytes (Snabaitis et coll. CircRes 2008). Aussi, l'insuline stimule la fusion de vésicules golgiennes riches en GLUT4 (transporteur d'hexose de la membrane plasmique) avec la membrane

plasmique des adipocytes pour augmenter le transport de glucose dans les cellules (Leto et Saltiel NatRevMolCellBiol 2012).

## 2 - Sujet d'étude de la thèse

Mon laboratoire d'accueil s'intéresse spécialement aux transporteurs secondaires de la membrane lysosomale qui assurent les échanges entre le lysosome et le cytosol. Pour rappel, le lysosome est un organe dégradatif de la cellule qui catabolise, grâce aux hydrolases « acides » (actives à bas pH), les macromolécules à longue durée de vie et les organites ou débris cellulaires qui lui sont acheminées par des voies diverses : macro-autophagie, micro-autophagie, endocytose, phagocytose, ou transport spécifique (autophagie médiée par les chaperons).

Les constituants élémentaires (acides aminés, nucléotides, sucres, lipides) libérés de ces macromolécules par l'hydrolyse sont réincorporés dans un nouveau cycle de vie après avoir été évacués vers le cytosol par les transporteurs secondaires du lysosome.

Une des thématiques de recherche de mon laboratoire d'accueil concerne l'identification et la caractérisation de transporteurs de ce type dont la fonction n'a pu encore être éclaircie. En effet, la connaissance actuelle de ces protéines reste encore restreinte. Moins d'une dizaine a pu être caractérisée sur le plan fonctionnel jusqu'ici tandis que les études protéomiques les plus récentes, probablement encore incomplètes, en recensent plus d'une quarantaine (Chapel et coll. MolCellProteomics 2013).

Outre la difficulté technique d'étude des transporteurs lysosomaux (nous y reviendrons), leur identification même constitue une première barrière à surmonter car, contrairement par exemple aux transporteurs mitochondriaux qui appartiennent à la même famille, il n'existe pas de cluster protéique commun aux transporteurs du lysosome. Les études génétiques de maladies lysosomales et, plus largement, les progrès récents de la protéomique comparative appliquée aux membranes biologiques ont progressivement comblé ce recensement des protéines impliquées. Celles-ci se distribuent effectivement dans diverses familles et superfamilles de transporteurs.

Une famille protéique a retenu tout particulièrement l'attention de mon équipe d'accueil car son membre fondateur est un transporteur lysosomal largement étudié dans notre laboratoire : il s'agit de la cystinosine, un transporteur lysosomal de cystine découvert par le groupe de Corinne Antignac à l'hôpital Necker et dont la dysfonction entraîne une maladie lysosomale multi-systémique, la cystinose (Kalatzis et coll. EMBO J 2001). Les autres protéines de cette famille, de fonctions inconnues, se caractérisent par la présence de 7 hélices alpha transmembranaires et par la répétition d'un motif de type "PQ". La séquence consensus de ces motifs possède une paire proline-glutamine très conservée, d'où son nom de baptême (on parle aussi de « motif cystinosine »).

**Mon travail de thèse a porté sur l'identification et la caractérisation d'une nouvelle protéine lysosomale à motif PQ et sur son implication dans le traitement pharmacologique de la cystinose.** Dans une seconde partie, j'ai cherché à élargir le sujet à l'ensemble de la famille des protéines à

motif PQ par une analyse bioinformatique des symétries de séquence destinée à orienter les études de structure/fonction vers des résidus particuliers.

La suite de cette introduction présente de manière plus détaillée cette famille protéique et la cystinose.

### 3 - Les protéines à motif PQ et leurs dysfonctions chez l'homme

#### 3.1 - Définition du motif PQ

De manière générale, un motif peptidique se définit par une même conservation d'un ensemble de résidus dans la séquence primaire de protéines, homologues ou non, qui possède une fonction biologique associée. Son rôle peut être structural, fonctionnel ou associé à un recrutement protéique. Par exemple, dans le cas d'un motif présent sur des protéines non homologues, il peut s'agir d'un motif d'interaction avec une famille spécifique de protéines (kinases, protéines d'échafaudage, adaptateurs de manteau protéique, etc).

Le motif PQ a été découvert relativement tardivement. Sa particularité est d'être doublement répété au niveau de boucles cytosoliques et segment transmembranaire (TM) adjacent à ces boucles sur l'ensemble des membres d'une famille protéique à 7 segments transmembranaires. Cette famille de protéines résulterait d'une ancienne duplication interne des TMs 1-3 et 5-7 fusionnés avec le TM4, soit une topologie de type 3-1-3 (Zhai et coll. BiochimBiophysActa 2001).



A l'appui de ce scénario, des homologues procaryotes lointains de ces protéines possèdent généralement 3TMs et un seul motif PQ (Xuan et coll. PNAS 2013). Le développement d'outils bioinformatiques dédiés à la recherche de répétitions intra-protéiques a été la clé de la découverte de cette famille de protéines et du motif. Le motif PQ est ainsi défini par la séquence conservée à 75% dans l'ensemble des duplicas relevés (Ponting et coll. GenomeRes 2001) (figure 9). Dans cette famille de protéines à motif PQ, seule la cystinosine, transporteur lysosomal de cystine, avait été caractérisée fonctionnellement avant ce travail, ce qui l'amène à être le membre fondateur de cette famille protéique.

CTNS	Hs 1	ISFYPOVIMNRRKSVIGLSFDFVALNLTGFV
CTNS	Hs 2	VKYFPQAYMNFYKSTEGWSIGNVLLDFTGGS
SL15	Hs 1	LVKLPQVFKIRGAKSAEGISLQSVMLLELVALT
SL15	Hs 2	VGRLLQATNYHNGYTGQLSAITVFLFLFGGSL
SL15	At 1	TVKLPQIMKIVDNKSVKGLSVVAFELEVIGYT
SL15	At 2	SARLPQIWKINFRNKSTGQLSFLTCLMNFEGAL
ERS1p	Sc 1	ISMYPPIITNWRHKSASAIMDFVMLNTAGYS
ERS1p	Sc 2	IKYIPQVTHNSTRKSMDCFPPIQGVFLDVTGGI
CG17119	Dm 1	VSFYPOIWSNYRRKSV EGLNFDLALNIVGFT
CG17119	Dm 2	IKYVPOALMNYRRKSTSGWSIGNILLDFTEGT
CG3792	Dm 1	LVKVPQVLKILNSKSGEGINIVGVLDLLAIS
CG3792	Dm 2	VGKLSQAYTNYQAGSTGQLSAATVIMMFAGSV
Consensus/75%		lsbbPQhbpNbppKSs.slsb.slbLpbsGhs

Figure 9. Alignement des séquences intra et inter protéiques dans la famille des protéines à motif PQ. Sont représentés dans ce tableau le gène codant pour la protéine (première colonne), l'espèce (deuxième colonne), le duplicat (troisième colonne) et la séquence (dernière colonne) des protéines détectées "à motif PQ" dans l'étude. La cystinosine est codée par le gène CTNS. La dernière ligne représente la séquence consensus du motif PQ, avec en majuscules et minuscules les acides aminés et types d'acide aminé conservés respectivement à plus de 75% et moins de 75% (Ponting et coll. GenRes 2001).

La base de données Pfam et une récente étude publiée au cours de ma thèse rapprochent, par analyse des séquences primaires, la famille PQ de la famille des protéines SWEET, des uniporteurs de sucre assurant des efflux membranaires du glucose chez les cellules animales et des influx ou efflux de sucres chez les plantes (Chen et coll. Nature 2010). Les protéines SWEET, découvertes récemment, possèdent aussi 7TMs et un motif dupliqué baptisé « MtN3/saliva/SWEET » à des positions analogues à celle des motifs PQ dans la cystinosine (Saudek PLoS One 2012). Les algorithmes prédisent une structure de type 3-1-3 de ces protéines, qui n'est encore pour l'instant pas prouvée expérimentalement.

### 3.2 - Connaissances actuelles sur les protéines à motif PQ.

La famille PQ comprend seulement cinq protéines chez l'homme. Il s'agit donc d'une petite famille protéique. Ces protéines possèdent parfois un ou plusieurs homologues de levure. Le dendrogramme suivant illustre les homologies de séquences inter et intra espèces.

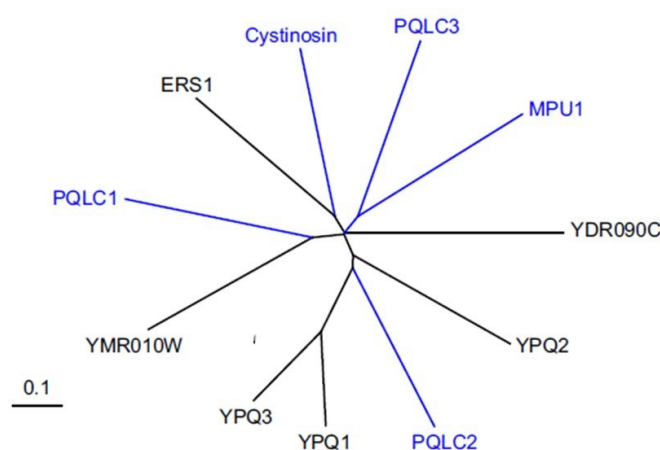


Figure 10. Dendrogramme de l'ensemble des protéines à motif PQ humaines (en bleu) et de levure (en noir).

Les pourcentages d'identité entre paralogues sont très faibles et sont même insuffisants pour détecter et aligner correctement les motifs PQ des différents membres entre eux grâce aux logiciels d'alignement de séquence. Ceci explique l'émergence tardive de cette famille protéique qui possède pourtant une topologie prédite similaire et un motif relativement bien conservé.

Les propriétés communes que confère le motif PQ à ces protéines n'est pas encore déterminé. Néanmoins, certains membres sont déjà bien décrits dans la littérature et, dans le cas de la cystinosine, la fonction moléculaire a été élucidée.

### **3.2.1 - Cystinosine**

Cette protéine membranaire est la mieux caractérisée dans la famille PQ. Son rôle est d'évacuer vers le cytosol la cystine issue de l'hydrolyse de protéines dans la lumière lysosomale. Sa dysfonction chez les patients atteints de cystinose entraîne l'accumulation de cystine, dimère oxydé de la cystéine, dans les lysosomes de la plupart des tissus. La cystine est un composé peu soluble dans l'eau et forme rapidement des cristaux dès lors que sa concentration augmente dans le lysosome. Cette accumulation de cystine perturbe la fonction lysosomale et conduit à un dysfonctionnement de divers organes. La prévalence de la maladie est d'environ 1 naissance sur 100 000 ou 200 000 à l'échelle mondiale et touche l'ensemble des groupes ethniques. Certaines populations sont cependant plus touchées. Par exemple, l'incidence est de 1 sur 20 000 naissances en Bretagne (Kalatzis et coll. JAmSocNephrol 2001).

### 3.2.1. a) *Signes cliniques de la cystinose*

La cystinosine s'exprimant de manière ubiquitaire, il n'est pas étonnant que sa dysfonction impacte un grand nombre d'organes. Cependant, certains organes sont affectés de manière précoce et avec une plus grande sévérité. Dès le plus jeune âge, les patients cystinotiques ont une atteinte au niveau d'un organe vital, le rein. La cystinose est notamment la cause majeure chez les sujets jeunes du syndrome de Fanconi, qui est défini par une dysfonction du tubule proximal, responsable de la réabsorption dans le sang de l'eau, des acides aminés, des ions ou de diverses autres petites molécules contenus dans les urines primitives (Nesterova et Gahl *PediatrNephrol* 2013). Ce défaut de réabsorption entraîne une polyurie et une pénurie de sels minéraux et de vitamines, qu'il faut supplémenter par voie orale.

Les symptômes liés sont multiples. L'hyperaminoacidurie occasionne une déminéralisation osseuse ainsi qu'un rachitisme. Le faible taux de bicarbonate dans le sérum induit une acidose métabolique, qui retarde la croissance des jeunes patients. La combinaison d'autres symptômes comme l'anorexie, les vomissements répétés, les difficultés de nutrition avec la perte importante de nutriments sont la cause d'un bilan nutritif pauvre, qui n'arrange pas les problèmes de croissance.

La perte excessive d'eau entraîne une émission quotidienne de deux à six litres d'urine, qui peut conduire à une déshydratation sévère et de faibles taux en électrolytes lors de gastroentérites aiguës. La déshydratation du nourrisson peut aussi conduire à une légère fièvre chronique.

L'hyperphosphaturie ainsi que l'hypercalciurie ont pour conséquence la néphrocalcinose médullaire rénale qui est responsable, à un stade avancé de la maladie (8 à 12 ans), de la perte de fonction rénale.

L'accumulation de cystine dans la cornée génère des cristaux pouvant être même visibles à l'œil nu (figure 11). Ce phénomène entraîne une photophobie chez le patient ; il est ébloui par la lumière et la cornée est douloureuse.

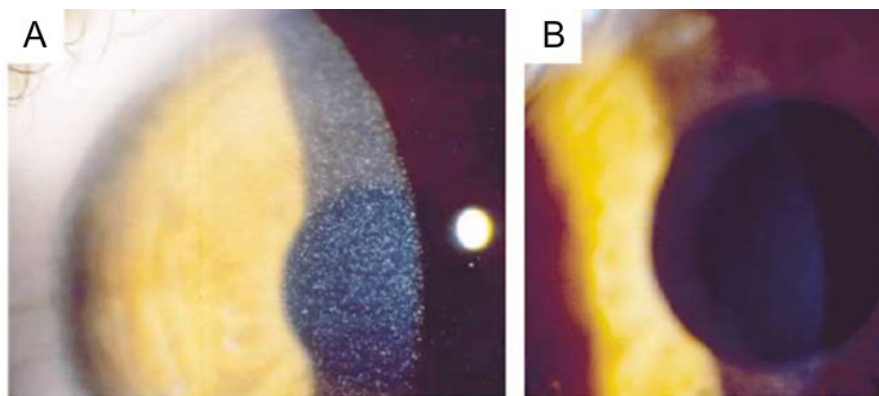


Figure 11. Symptôme oculaire de la cystinose et effet du traitement par la cystéamine. L'œil d'un patient cystinotique est examiné sous une lampe à fente avant (A) et après traitement de 25 mois à la cystéamine (B), appliquée sous forme de collyre. Les cristaux de cystine visibles avant traitement disparaissent après traitement (Gahl et coll. 2002).

Un hypothyroïdisme précoce est aussi constaté dans le diagnostic de la maladie. Plus tardivement, de sévères complications apparaissent telles que la détérioration et la calcification du système nerveux central, ou bien une dysfonction pulmonaire en général létale. On observe aussi un hypogonadisme des patients masculins, qui cependant n'affecte pas la reproduction (Gahl et coll. NEnglJMed 2002).

TABLE 1. AGE-RELATED CLINICAL CHARACTERISTICS OF UNTREATED NEPHROPATHIC CYSTINOSIS.		
AGE	SYMPTOM OR SIGN	PREVALENCE IN AFFECTED PATIENTS %
6–12 mo	Renal Fanconi's syndrome (polyuria, polydipsia, electrolyte imbalance, de- hydration, rickets, growth failure)	95
5–10 yr	Hypothyroidism	50
8–12 yr	Photophobia	50
8–12 yr	Chronic renal failure	95
12–40 yr	Myopathy, difficulty swallowing	20
13–40 yr	Retinal blindness	10–15
18–40 yr	Diabetes mellitus	5
18–40 yr	Male hypogonadism	70
21–40 yr	Pulmonary dysfunction	100
21–40 yr	Central nervous system calcifications	15
21–40 yr	Central nervous system symptomatic deterioration	2

Figure 12. Tableau des symptômes associés à la cystinose, avec leur âge moyen d'apparition (colonne gauche) et leur prévalence (colonne droite) (Gahl et coll. NEnglJMed 2002).

### 3.2.1. b) *Hétérogénéité clinique de la cystinose*

L'âge d'apparition et la sévérité des signes cliniques divergent selon la forme clinique de la maladie. La forme la plus répandue (95% des cas) est malheureusement la forme sévère. Elle est dite néphropathique et survient dans la première décennie de la vie. Elle conduit progressivement à la perte de la fonction rénale, ainsi qu'à une photophobie induite par l'apparition de cristaux cornéens de cystine. Les autres symptômes précédemment cités sont aussi dans le diagnostic. La survie du patient sans intervention médicale ne dépasse pas la quinzaine d'année.

La forme intermédiaire de la cystinose a toutes les manifestations cliniques de la forme néphropathique mais son apparition est plus tardive, vers l'adolescence, et sa progression est plus lente.

La forme non-néphropathique, dite forme adulte ou forme oculaire, est caractérisée uniquement par des cristaux cornéens et donc une photophobie.

### 3.2.1. c) *Génétique de la maladie*

La transmission de la cystinose est autosomale récessive. L'identification du gène défectueux, baptisé *CTNS*, sur le bras court du chromosome 17 (bande 17p13) a été effectuée par clonage positionnel dans l'équipe de C.Antignac (Town et coll. NatGenet 1998). Cette percée a permis d'engager tout un champ de recherches sur le diagnostic et la relation génotype/phénotype de la maladie, l'étude de la physiopathologie et l'exploration de nouveaux traitements dans un modèle murin, ainsi que, sur un plan plus fondamental, l'étude moléculaire et cellulaire de la protéine.

L'hétérogénéité clinique mentionnée plus haut est associée à une hétérogénéité génétique. Il existe plus de 80 mutations du gène *CTNS*. La mutation la plus répandue est une délétion de 65kb qui supprime 10 des 12 exons du gène. Elle est associée à la forme infantile de la maladie. Il existe aussi diverses mutations : non-sens, délétions, insertions, mutations d'épissage et mutations faux-sens. Les mutations affectant l'intégrité de la protéine sont associées à une forme infantile. Sauf de rares exceptions, les mutations faux-sens observées chez les patients de type infantile abolissent l'activité de transport de cystine dans un test in vitro de la cystinosine recombinante (Kalatzis et coll. Hum Mol Genet 2004).

A l'opposé, la forme oculaire est associée à une mutation faux-sens particulière (G197R) sur au moins l'un des deux allèles, et cette mutation préserve partiellement le transport de cystine. L'activité résiduelle du mutant G197R est de 20%, une valeur en accord avec l'absence de maladie chez les sujets hétérozygotes porteurs d'une mutation de type infantile.

### 3.2.1. d) *Description de la protéine*

Le produit du gène *CTNS*, la cystinosine, est un polypeptide de 367 acides aminés. L'analyse de sa séquence prédit une topologie comportant 7TMs, avec un grand domaine N-terminal (120 acides aminés) possédant 7 sites de N-glycosylations, présent dans la lumière lysosomale, et une courte extrémité C-terminale cytosolique. Une étude effectuée récemment dans le laboratoire par Xiong Chen, post-doctorant, à l'aide de la technique SCAM (*single-cysteine accessibility mutagenesis*) a confirmé cette prédiction topologique (manuscrit en cours de rédaction).

L'étiquetage de la cystinosine par la GFP ou un autre rapporteur a permis d'observer sa localisation intracellulaire et de confirmer sa présence sur les lysosomes et endosomes tardifs (Cherqui et coll. JBiolChem 2001). Cette localisation est déterminée principalement par la présence d'un motif de type tyrosine (YXXQ) à l'extrémité C-terminale. Ce motif permet l'interaction avec les protéines adaptatrices de type AP, qui assurent le recrutement de protéines spécifiques lors de la formation d'une vésicule de trafic intracellulaire par un manteau protéique. Lorsqu'on mute ou délète ce motif tyrosine, la cystinosine est redirigée vers la membrane plasmique.



Néanmoins, la redirection à la membrane plasmique après mutation du motif tyrosine n'est pas totale et suggère la présence d'un deuxième motif d'adressage dans la séquence protéique, ou d'un autre mécanisme d'adressage (par exemple, association à une autre protéine lysosomale). Pour évaluer la première hypothèse, l'équipe de Corinne Antignac a effectué des mutations dans d'autres régions de la cystinosine et observé que la double délétion du motif tyrosine et d'une partie du second motif PQ permet de délocaliser totalement la protéine vers la membrane plasmique. Néanmoins, le mécanisme sous-jacent reste obscur car des mutations ponctuelles du second motif PQ n'ont aucun effet, ce qui suggère plutôt un mécanisme indirect.

#### 3.2.1. e) *Caractérisation de l'activité de transport.*

La preuve directe du transport de cystine a été donnée en 2001 par mon équipe d'accueil et le groupe de C. Antignac en exploitant l'effet de délocalisation à la membrane plasmique du mutant du motif à tyrosine (Kalatzis et coll. EMBO J 2001). En effet, ce mutant permet de remplacer les mesures de transport sur des fractions intracellulaires, requérant un travail préalable important (transfection stable, fractionnement etc), par des mesures sur cellules entières directement accessibles dans un puits de culture. En acidifiant le milieu extracellulaire, on mime l'environnement lysosomal et l'on remplace l'efflux lysosomal par un influx cellulaire facile à mesurer. Cette approche a permis de mesurer et caractériser l'activité transport de cystine du mutant du motif à tyrosine.

Dans cette même étude, les auteurs ont aussi démontré la dépendance du transport vis-à-vis d'un gradient de proton, généré dans le lysosome par la V-

ATPase. L'hypothèse émise à la suite de ces expériences est que la cystinosine catalyse un symport de cystine et de protons.

Plus récemment, mon équipe d'accueil a repris le fil de ces recherches pour démontrer l'existence de ce symport et disséquer son mécanisme (Ruivo et coll. PNAS 2012). Pour cela, les chercheurs ont implémenté l'approche sur cellules entières dans des ovocytes de Xénope et remplacé les mesures biochimiques du transport (flux de molécule radioactive) par des mesures électrophysiologiques de courant de transport. L'avantage de cette technique est sa grande résolution temporelle et la capacité de contrôler le potentiel de membrane à une échelle de temps inférieure à la milliseconde. Ces atouts en font une technique incomparable pour disséquer des mécanismes.

Pour évaluer la stoechiométrie du symport proton/cystine, les auteurs ont combiné l'électrophysiologie et la mesure d'accumulation de substrat radioactif. Ceci permet de déterminer le rapport entre la quantité de charges et la quantité de cystine accumulée par la cystinosine. Ces mesures ont abouti à un rapport d'une charge pour une cystine, soit 1:1. La cystine étant zwitterionique à pH5 (auquel ont été effectuées ces mesures), ces expériences ont établi l'existence d'un co-transport d'ions avec la cystine. L'identité de cet ion a été déterminée en complétant ces expériences par des mesures de pH au voisinage des ovocytes lorsqu'on active le transport. La cystinosine co-transporte donc les protons et les molécules de cystine avec une stoechiométrie 1:1.

Pour mieux comprendre le phénomène, les chercheurs ont analysé en électrophysiologie les courants transitoires induits par des sauts de potentiels

membranaires sur le modèle de l'ovocyte de Xénope. En travaillant en condition saturante et à un pH extracellulaire de 7,5, ils ont pu détecter des mouvements de charges au sein de la membrane plasmique, indépendant du transport (car absent à pH 7,5), correspondant à l'enchâssement d'une charge positive dans la membrane par molécule de cystinosine.

D'autre part, en utilisant de l'eau lourde dans le milieu extracellulaire, ils observent une réduction de la vitesse de transport de deux fois, soit le même rapport que celui de l'augmentation du poids moléculaire des protons dans le milieu.

Ces deux observations convergent ainsi vers le transport d'une cystine associé à celui d'un proton pour chaque cycle de transport de la cystinosine. Ces travaux aboutissent aussi à une estimation du turnover du transporteur à  $27\text{ s}^{-1}$ .

Pour compléter ce travail, les chercheurs ont voulu comprendre le mécanisme sous-jacent à la translocation de proton en mutant ponctuellement une large part des acides aminés protonables d'évaluer l'impact sur les courants transitoires.

Seule la mutation de l'aspartate en position 305, hautement conservé dans la cystinosine a pu abolir le courant transitoire. La neutralisation de ce résidu annule aussi la translocation de charge à travers la membrane lors du transport, autrement dit le courant stationnaire. Le rôle de cet aspartate est donc fortement suggéré comme responsable du co-transport de proton.

Ce résidu D305 est situé au sein d'un segment transmembranaire dans le deuxième domaine répété de la protéine. Sa conservation est totale chez les orthologues de la cystinosine mais ne l'est par ailleurs pas dans les autres protéines à motif PQ. Le premier domaine répété de la cystinosine ne contient pas de résidu anionique en position équivalente du D305 ce qui lui confère un caractère unique dans cette protéine pseudo-symétrique. Sa forte conservation est exclusive de la cystinosine dans la famille PQ et ce résidu est présent dans un seul des deux domaines répété. Il ne fait donc pas partie de la séquence consensus du motif PQ.

### 3.2.1. f) *Traitement de la cystinose*

Avant qu'un traitement médicamenteux ne soit découvert, seule la déficience rénale pouvait être traitée grâce à la greffe d'un organe non atteint.

Cette solution ne traite qu'un aspect de la maladie et ne remédie pas aux autres symptômes. Elle possède aussi tous des inconvénients d'un tel acte chirurgical comme la prise médicamenteuse contraignante, la fragilité due à l'immunodépression ou bien simplement le rejet à terme du greffon.

Une solution pharmacologique a pu être trouvée et consiste à la prise médicamenteuse de Cystagon® par voie orale ou bien sous forme de collyre. Ce médicament a pour principe actif la cystéamine, molécule présente naturellement dans les cellules. Ce composé sulfuré perméant entre dans le lysosome et interagit avec la cystine accumulée pour former un disulfure mixte ensuite déplété du lysosome à plus de 90% par une voie secondaire d'échappement (figure 13) (Gahl et coll. JBiolChem 1982).

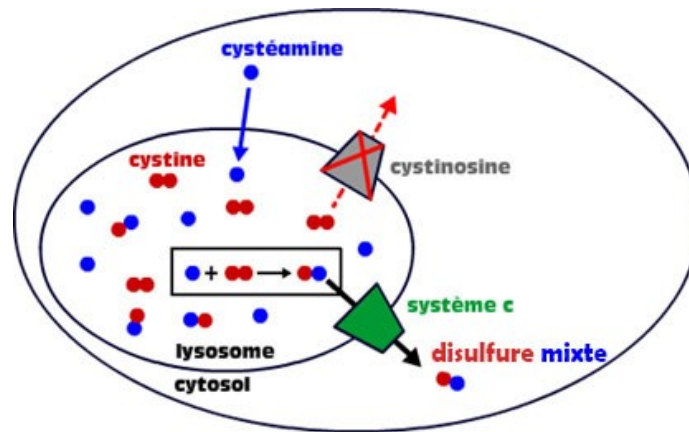


Figure 13. Schéma illustratif du mécanisme d'action supposé du traitement de la cystinose par la cystéamine.

La similarité de structure entre le disulfure mixte formé et la lysine (figure 14) a dès lors orienté les recherches sur la voie de transport des acides aminés cationiques du lysosome.

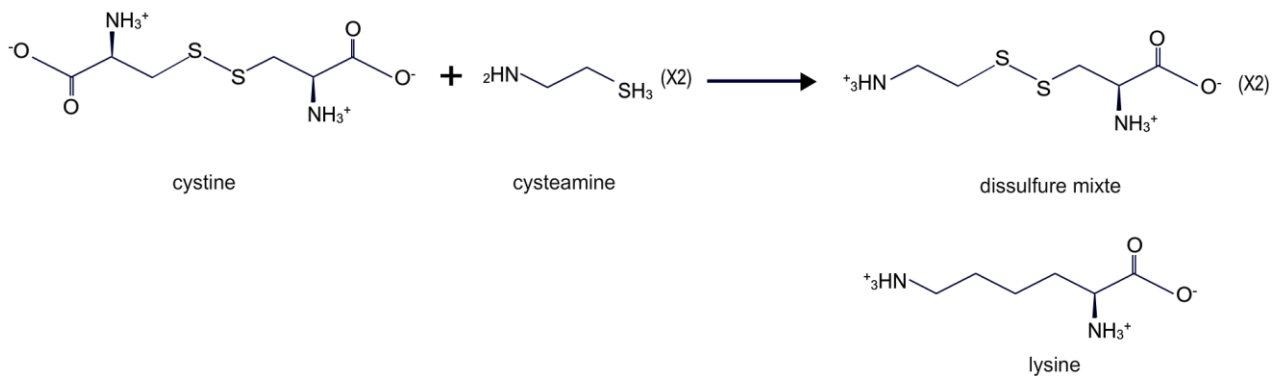


Figure 14. Réaction chimique du traitement de la cystinose par la cystéamine et similarité de structure entre le produit de réaction et la lysine, acide aminé basique.

Des études biochimiques sur des lysosomes purifiés de fibroblastes humains ont pu détecter cette voie secondaire supposée par observation de l'efflux des acides aminés cationique du lysosome, baptisé "system c", sans déterminer pour autant les responsables moléculaires du phénomène (Pisoni et coll. J Biol Chem 1982).

Depuis, aucune étude n'a pu caractériser à l'échelle moléculaire le mécanisme d'action du traitement de la cystinose.

Le traitement de la cystinose par la cystéamine possède cependant plusieurs points négatifs:

- Le traitement actuel de la cystinose ne fait que ralentir la maladie et permet d'éviter l'atteinte glomérulaire qui survient dans un second temps. La fonction rénale est conservée mais le syndrome de Fanconi persiste ce qui n'apporte pas au patient une qualité de vie normale.
- la métabolisation du principe actif est rapide ce qui entraîne une prise du médicament toutes les 6heures et contraint donc le patient à un réveil nocturne pour respecter la posologie.
- La mauvaise haleine due au composé soufré ingéré a des implications sociales et entraîne parfois un arrêt volontaire de l'observance médicamenteuse.
- La cystéamine n'agit pas spécifiquement sur la cystine et son excès dans la cellule peut entraîner la transformation d'autres composés, ce qui pourrait impliquer d'autres effets secondaires mais ceci n'a pas encore été étudié.

La compréhension du mécanisme sous-jacent au traitement est donc un point clé pour envisager l'amélioration de la pharmacothérapie.

La cystinosine est le membre de la famille PQ le seul caractérisé avant cette étude. Cependant un autre membre est le sujet de recherche de plusieurs études publiées, MPU1.

### 3.2.2 - MPU1, protéine membranaire du RE.

Pour permettre une meilleure compréhension des connaissances actuelles sur MPU1, il est nécessaire de faire un bref rappel schématique sur les premières étapes de N-glycosylation des protéines dans le réticulum endoplasmique (figure 15).

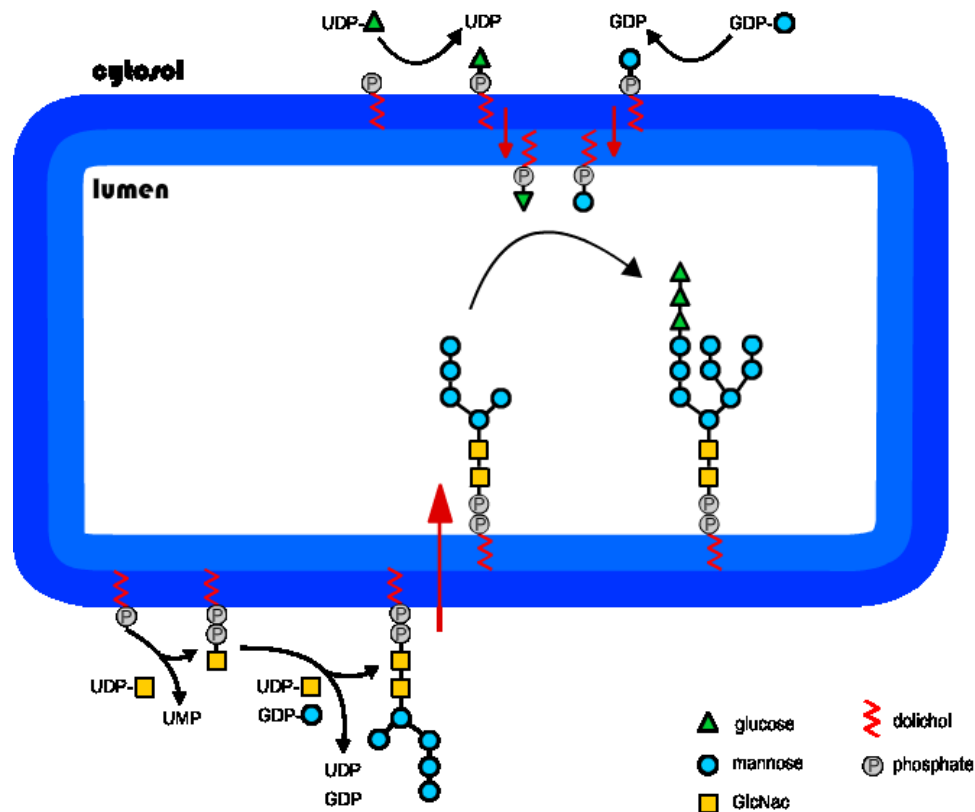


Figure 15. Schéma des étapes de N-glycosylation dans le réticulum endoplasmique (RE). Les monosaccharides sont d'abord activés dans le cytosol avant d'être ajoutés au dolichol-pyrophosphate (dol-PP). Les premières réactions, qui utilisent comme donneurs l'UDP-*N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) et le GDP mannose (GDP-Man) se déroulent sur la face cytosolique de la membrane du RE. S'ensuit une étape de flip-flop du dol-PP-Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, des donneurs dolichol-phospho-mannose (dol-P-Man) et du dolichol-phospho-glucose (dol-P-Glc) coté luminal du RE (flèches rouges). Ceci permet d'ajouter quatre mannoses supplémentaires et trois glucoses dans la lumière du RE, formant ainsi le Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-dol-PP. L'oligoSaccharylTransférase (OST) transférera l'arbre oligosaccharidique néoformé vers une asparagine de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr d'un polypeptide en cours de biosynthèse dans la lumière du RE.

### 3.2.2 a) *Génétique et protéine*

Le gène codant pour MPU1, MPDU1, est situé dans la région p13.1p12 du chromosome 17 (Anand et coll. MolBioCell 2001). Il code pour une protéine de 288 acides aminés, prédite à sept segments transmembranaires, qui possède un motif de rétention au réticulum endoplasmique.

### 3.2.2 b) *Fonction supposée de la protéine*

La fonction exacte de MPU1 n'est pas encore élucidée. Néanmoins deux études distinctes décrivent les implications de la protéine dans le système de N-glycosylation des protéines.

Ces études ont été effectuées sur des cellules CHO (Chinese Hamster Ovarian) sauvages ou mutées pour le gène de hamster Lec35, orthologue du gène humain MPDU1, ou bien sur des cellules de patients mutés pour MPDU1, le gène codant pour la protéine MPU1 (Kranz JClinInvest 2001; Schenk et coll. JClinInvest 2001).

Elles mettent en évidence par HPLC une proportion importante de protéines avec un arbre oligosaccharidique incomplet dans les cellules mutantes. La précision de l'HPLC leur permet aussi d'observer divers profils incomplets d'oligosaccharides dolichol-PP liés dans les souches cellulaires mutées.

Malgré l'aspect disparate des profils, il existe un point commun entre ceux-ci qui permet d'envisager la fonction de la protéine.

En effet, la glycosylation dans l'ensemble des populations cellulaires mutées est normale tout au long des étapes coté cytosolique mais dès le passage coté luminal



par flip flop du dol-PP-Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, les oligossacharides dol-PP liés présentent des défauts de glycosylation. Ni le flip-flop du dol-PP-Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, ni le transfert oligosaccharidique ne semblent atteints puisque l'on retrouve dans les cellules mutées des protéines N-glycosylées avec un arbre oligosaccharidique incomplet.

La protéine MPU1 joue donc probablement un rôle dans le passage des dol-P-Man et dol-P-Glc à travers la membrane du réticulum endoplasmique. L'observation de protéines avec des arbres glycosidiques complets dans les cellules déficientes en MPU1 traitées avec des détergents semble corroborer cette hypothèse.

### **3.2.2 c) Pathologie associée au défaut de fonction de MPU1**

La déficience de MPU1 est associée à une maladie autosomale récessive dite CDG de type If (pour Carbohydrate-Deficient Glycoprotein), dont les symptômes apparaissent dès la période néo-natale.

Les symptômes cliniques de cette maladie sont un retard psychomoteur, des convulsions, un retard staturo-pondéral ou bien des anomalies cutanées et oculaires. La sévérité des symptômes est variable selon les patients mais peut aller jusqu'à la mort prématurée de l'individu touché par la maladie.

Au niveau cellulaire, on constate que les profils d'accumulation post-étape "dol-PP-Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>" (après flip-flop) sont de trois types selon les différentes mutations trouvées chez les patients : (1) absence d'utilisation de dol-P-Man,

(2) absence d'utilisation de dol-P-Glc et (3) utilisation partielle de dol-P-Glc et dol-P-Man.

Le défaut d'utilisation unique du dol-P-Man ou du dol-P-Glc suggère que les mutations altèrent la sélectivité du substrat. Pour ce qui concerne l'utilisation partielle, il a été suggéré que les mutations en questions seraient sur le point concernées pourraient affecter l'ancrage de la protéine dans les RAFTS où se trouvent les donneurs et ainsi ralentir la cinétique de transfert des donneurs à travers la membrane. Pour le moment, aucun traitement n'existe pour rectifier les défauts de glycosylations de protéines que la pathologie entraîne.

### **3.2.3 - PQLC1 et PQLC3, terrains d'étude encore vierges.**

Les bases de données disponibles comptent deux autres protéines humaines à motif PQ qui n'ont fait jusqu'à lors l'objet d'aucune recherche.

PQLC1 est une protéine de 271 acides aminés, proche de la taille de PQLC2 (291 AA). Elle possède deux motifs PQloop et est prédite à 6 segments transmembranaires par les algorithmes dédiés. Aucun motif d'adressage connu n'est présent dans les boucles cytosoliques prédites. Cette protéine semble posséder un orthologue de levure de séquence proche, YMR010w.

PQLC3 est la protéine à motif PQ la plus courte, soit 202 acides aminés. Aucun motif d'adressage connu ne se distingue dans les boucles cytosoliques. Cette protéine ne semble pas posséder d'homologue fongique tout comme MPU1 dont la séquence primaire est voisine. Ces deux protéines ont d'ailleurs la particularité

d'avoir un deuxième motif PQ peu commun où la proline du doublet "PQ" est absente.

### **3.2.4 - PQLC2, protéine d'intérêt de ma thèse.**

PQLC2 est une protéine de 291 acides aminés dont la structure est prédite à 7 segments transmembranaires. On retrouve dans les boucles cytosoliques deux motifs PQ comparables à ceux de la cystinosine mais ne possédant pas l'aspartate clé du co-transport de proton, du moins à la position équivalente.

Les seules données de la littérature sur la fonction de PQLC2 disponibles au début de ma thèse ont été obtenues chez la levure *S.pombe*. En effet, une étude coréenne sur les levures montre (1) l'augmentation du transcrit de *Stm1*, homologue de PQLC2 chez *S.pombe*, lorsque les levures poussent dans un milieu pauvre en sources azotées (2) l'augmentation du taux d'AMPc dans les cellules lors de la surexpression de *Stm1* (3) l'interaction, par la technique de double hybride, avec une petite protéine G (*Gpa2*) connue pour être activée par un récepteur couplé aux protéines G, senseur du glucose extracellulaire, et pour réguler l'adénylate cyclase par interaction directe (Chung et coll. *JBiolChem* 2001). Les conclusions découlant de ces résultats sont que la protéine *Stm1*, orthologue de PQLC2, pourrait être un senseur d'azote extracellulaire capable de déclencher une cascade de signalisation pour induire la croissance cellulaire.

L'élucidation de la fonction de PQLC2 a été le résultat principal de mon travail de thèse.

# Résultats

## Chapitre 1

### **Identification et caractérisation de la protéine PQLC2 et de ses orthologues de levure**

Parmi les protéines à motif PQ, seule l'activité de la cystinosine était caractérisée au début de ma thèse. Un autre membre de cette famille protéique, MPU1, intervient dans la synthèse des précurseurs de N-glycosylations, mais son rôle moléculaire précis reste inconnu. L'élucidation de l'activité d'un nouveau membre, PQLC2, au cours de ma thèse est née de la convergence de deux lignes de recherche de l'équipe d'accueil en collaboration avec d'autres groupes.

D'une part, le laboratoire avait engagé il y a plusieurs années une collaboration avec Agnès Journet et Jérôme Garin (Inserm/CEA Grenoble) pour identifier de

nouvelles protéines membranaires du lysosome par analyse protéomique. Cette étude, publiée récemment (Chapel et coll. MolCellProt 2013), a permis de cartographier la membrane lysosomale, en identifiant 734 protéines dont environ 80 protéines de transport (transporteurs secondaires, pompes ioniques, protéines ABC ou canaux ioniques). Une grande partie de ces protéines polytopiques avait échappé aux études protéomiques antérieures (Schröder Proteomics 2010, Della Valle MolCellProt 2011). Parmi les nouvelles protéines, la présence d'une autre protéine PQ que la cystinosine, PQLC2, avait attiré l'attention de l'équipe. Il faut noter que la cystinosine est, quant à elle, absente du protéome décrit par Chapel et coll. car un seul peptide avait pu être détecté (critère insuffisant pour être retenu dans la liste). Cette difficulté de détection de la cystinosine avait déjà été notée par d'autres laboratoires.

Indépendamment de ces travaux, un généticien de la levure, Bruno André (Université Libre de Bruxelles) a contacté B.Gasnier car son groupe avait identifié de nouvelles protéines PQ de levure, baptisée Ypq 1 à 3 (*Yeast PQ protein*) dans la vacuole, et avait obtenu des données indirectes suggérant une fonction de transport vacuolaire d'acides aminés. Ces indices fonctionnels, détaillés plus loin dans ce chapitre, et la similarité des protéines Ypq1-3 avec PQLC2 ont été des facteurs clés de la réussite de cette étude.

# 1 - Identification et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle protéine membranaire lysosomale.

## 1.1 - PQLC2 est localisé à la membrane lysosomale

### **1.1.1 – Analyse Protéomique de la membrane lysosomale**

Comme nous l'avons indiqué, Agnès Journet et ses collaborateurs ont détecté des peptides correspondant à la séquence de PQLC2 dans des fractions hautement purifiées de membranes de lysosomes de rat analysées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Comme la spectrométrie de masse est très sensible et que, par ailleurs, les purifications d'organites subcellulaires ne sont jamais totales, ce type d'approche est très sensible aux contaminants, donc aux faux-positifs.

Pour résoudre ce problème, nos collaborateurs ont utilisé une approche comparative semi-quantitative consistant à analyser non seulement les fractions purifiées de lysosomes, mais aussi les fractions écartées lors de la dernière étape de purification (regroupées ensemble pour simplifier l'analyse). Chacune de ces fractions a été soumise à des extractions à l'aide de solvants organiques et électrophorèse pour réduire la complexité des échantillons analysés par LC-MS/MS, et faciliter ainsi la détection des protéines peu abondantes. L'abondance relative d'une protéine donnée dans chaque échantillon est évaluée en comptant le nombre de spectres de masse révélant l'un de ses peptides (comptage spectral). Les analyses ont été effectuées sur trois répliquats biologiques indépendants. Le comptage spectral de chaque protéine détectée dans ces diverses fractions a été

utilisé pour calculer un indice spectral mesurant la « force » de son association aux lysosomes qui varie de -1 (protéine détectée exclusivement dans les fractions écartées) à +1 (détection uniquement dans les fractions enrichies en lysosomes). L'indice prend aussi en compte l'abondance globale de la protéine pour éviter de donner une valeur extrême à une protéine détectée dans un petit nombre de spectres.

PQLC2 a été détecté avec un indice spectral très élevé (0,892), bien au-dessus du seuil de pertinence statistique (0,594). Pour comparaison, un marqueur bien établi de la membrane lysosomale comme la protéine LAMP1 a été détecté avec un indice spectral de 0,755. Ces données de spectrométrie de masse indiquaient que PQLC2 était très vraisemblablement une protéine lysosomale et non un contaminant. Cependant, il importait de valider cette localisation par une méthode indépendante.

### **1.1.2 - Validation de la localisation subcellulaire par microscopie de fluorescence**

#### **1.1.2 a) Expression de PQLC2 sauvage.**

Afin d'observer directement la localisation subcellulaire de la protéine, j'ai construit un plasmide permettant l'expression dans des lignées cellulaires de la protéine PQLC2 de rat étiquetée en C-terminal par une protéine fluorescente (EGFP). J'ai ensuite exprimée de manière transitoire cette construction dans la lignée cellulaire humaine Hela. L'EGFP étant une protéine de taille conséquente, en comparaison à PQLC2, j'ai séparé les deux protéines par un linker pour éviter

autant que possible que la fonction de PQLC2 soit altérée par la fusion avec l'EGFP.

Les cellules transfectées ont ensuite été fixées et observées en microscopie à épifluorescence. Afin d'améliorer la résolution des lysosomes, j'ai utilisé une technique de section optique consistant à acquérir une pile d'images focalisées à diverses profondeurs selon l'axe z, puis à extraire le signal du plan central par traitement informatique de la pile d'images (déconvolution). Pour identifier les lysosomes, les cellules ont été soumises à un marquage d'immunofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine LAMP1 après leur fixation.

L'observation d'images déconvoluées, obtenues en microscopie à épifluorescence après deux jours d'expression, montre que PQLC2-EGFP possède une distribution ponctiforme colocalisant avec le marqueur de la membrane lysosomale LAMP1 (figure 16). PQLC2 est donc bien localisé sur les lysosomes et endosomes tardifs.

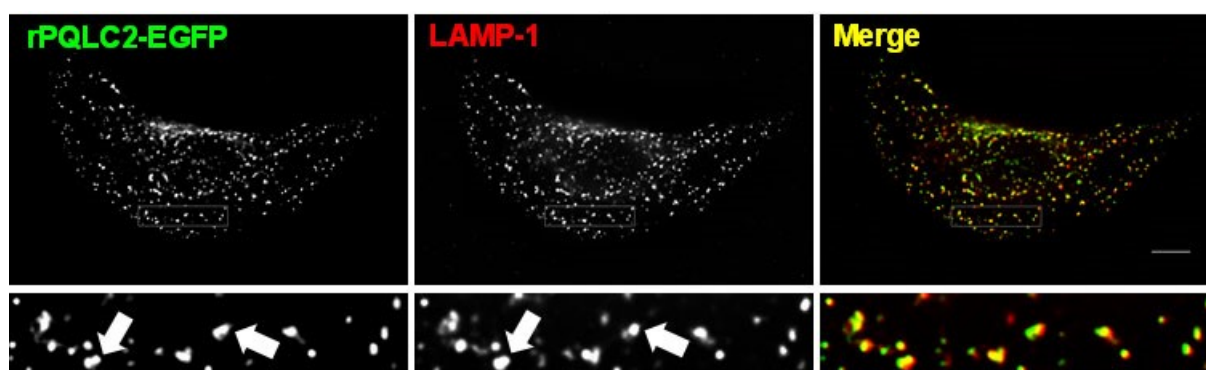


Figure 16. Déconvolution des acquisitions en épifluorescence d'une cellule Hela exprimant la protéine rPQLC2 fusionnée à l'EGFP (à gauche) et immunomarquage du marqueur lysosomal LAMP-1 (au milieu). Les flèches sur les agrandissements pointent la même région cellulaire pour chaque canal d'émission. Le merge (à droite) des deux fluorescences met en évidence la colocalisation des deux protéines. (Echelle = 10µm).



### 1.1.2 b) Expression de PQLC2 muté à son motif d'adressage lysosomal

Pour renforcer ces données et écarter l'éventualité d'une localisation lysosomale due à la surexpression et la dégradation de la protéine recombinante ou à la présence de l'étiquette EGFP, j'ai recherché dans la séquence de PQLC2 la présence d'un motif de localisation lysosomale. Ces motifs sont de petites séquences d'acides aminés situées dans une région cytosolique de la protéine et reconnues par un adaptateur (par exemple le complexe AP-1, 2 ou 3) du manteau protéique (par exemple la clathrine) responsable du bourgeonnement d'une vésicule de trafic intracellulaire à partir d'un compartiment donneur. Cette interaction détermine quels composants sont embarqués dans la vésicule navette et acheminés vers le compartiment accepteur. Il existe plusieurs types de motifs, reconnus par des adaptateurs différents et souvent désignés par la nature des résidus critiques pour l'interaction avec l'adaptateur (motif à tyrosine, à dileucine, ...).

L'examen de la séquence de PQLC2 a révélé la présence à l'extrémité C-terminale d'un motif potentiel de type dileucine (285-EREPLL-291). Selon les prédictions de topologie membranaire, PQLC2 aurait, comme la cystinosine, 7 hélices transmembranaires avec une extrémité N-terminale intra lysosomale N-glycosylée et une extrémité C-terminale cytosolique. Ce motif potentiel pourrait donc être reconnu par un adaptateur protéique. Afin de tester cette hypothèse, j'ai muté les deux leucines clés du motif en alanine (mutant PQLC2-LL290/291AA-EGFP, nommé ci-dessous plus simplement PQLC2-LL/AA-EGFP).

Après expression transitoire dans des cellules HeLa, j'ai observé une redistribution quasi-totale de la protéine. Au contraire de la protéine sauvage, PQLC2-LL/AA-EGFP présente une distribution diffuse avec une extension marquée au niveau des microvillosités suggérant une expression à la membrane plasmique (figure 17). L'acquisition présentée n'a pas subi de déconvolution pour mieux saisir le phénomène. Cette distribution peut s'expliquer par le fait que l'absence de signaux de ciblage entraîne généralement un acheminement par défaut à la membrane plasmique. Le motif dileucine 285-EREPLL-291 est donc responsable du ciblage de PQLC2 vers les lysosomes, et la présence d'un tel motif renforce l'idée que les lysosomes et endosomes tardifs correspondent bien à la localisation naturelle de la protéine.

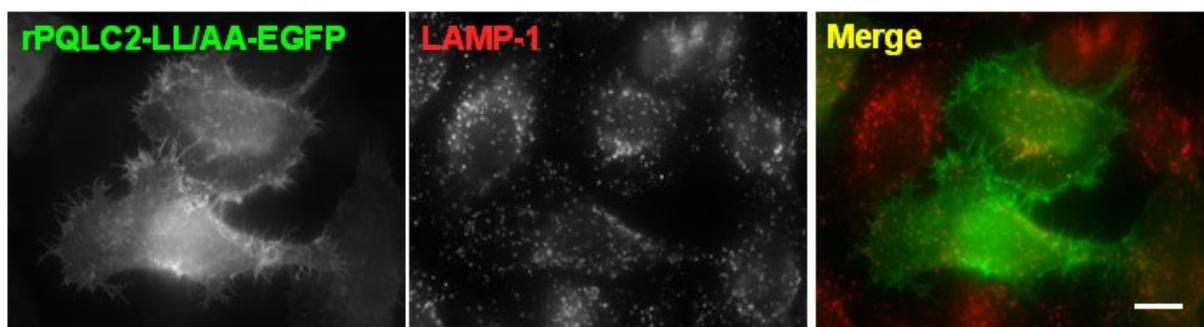


Figure 17. Acquisitions en épifluorescence d'une cellule Hela exprimant la protéine rPQLC2 fusionnée à l'EGFP mutée sur son motif d'adressage (à gauche) et immunomarquage du marqueur lysosomal LAMP-1 (au milieu). Le « merge » des deux fluorescences (à droite) montre l'absence quasi-totale de colocalisation des deux protéines dû à la délocalisation de PQLC2 à la membrane plasmique de la cellule. (Echelle = 10µm).

En conclusion, trois types de données concordantes (détection de la protéine native par protéomique comparative, microscopie de fluorescence de la protéine recombinante, présence d'un motif de ciblage) indiquent très clairement que PQLC2 est une protéine résidente de la membrane des lysosomes et endosomes tardifs, et que cette localisation dépend de la présence d'un motif de type dileucine à l'extrémité C-terminale.

## 1.2 - L'étude des orthologues de levure de PQLC2 suggère un rôle dans l'homéostasie des acides aminés basiques

### **1.2.1 - Les orthologues de levure de PQLC2 sont localisés à la membrane vacuolaire.**

La levure est un organisme unicellulaire eucaryote propice aux études génétiques et biochimiques, et dont de nombreux aspects sont conservés chez la cellule humaine. La vacuole de levure est un organe de dégradation du matériel biologique fonctionnellement comparable au lysosome des cellules animales, avec une fonction supplémentaire de stockage de métabolites apparemment marginale, ou moins étudiée, chez les animaux. La vacuole de levure est donc un bon modèle pour étudier les transporteurs membranaires du lysosome. L'orthologie de certains transporteurs vacuolaires avec les transporteurs lysosomaux a d'ailleurs été démontrée comme dans le cas de la cystinosine et de la protéine vacuolaire fongique Ers1 (Gao XD FEBS 2005).

L'équipe de Bruno André a effectué des travaux sur trois protéines Ypq de levure de boulanger (*S. cerevisiae*), voisines de la protéine PQLC2 lorsque l'on compare les arbres phylogénétiques de la famille des protéines à motif PQ chez la levure et

l'homme. Ils ont tout d'abord démontré leur localisation vacuolaire, suggérée préalablement par des études bioinformatiques pour Ypq1 et Ypq2. L'expression exogène de protéines étiquetées par l'EGFP associée à la coloration au FM4-64 de la membrane vacuolaire montre une nette colocalisation des deux marquages pour chacune des trois protéines (figure 18).

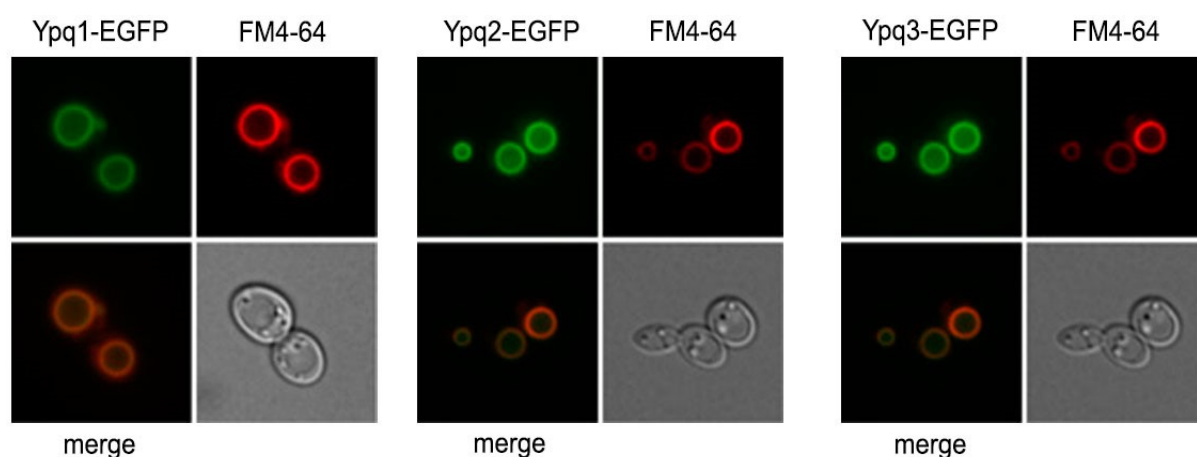


Figure 18. Acquisitions en épifluorescence de levures exprimant les protéines YPQ 1 à 3, étiquetée par l'EGFP (canal vert) et coloration de la vacuole par le FM4-64 (canal rouge). « Merge » des deux fluorescences (bas à gauche) et acquisition en lumière blanche (en bas à droite). La superposition des signaux montre que les protéines YPQ sont localisées dans la membrane de la vacuole fongique.

### 1.2.2 - L'expression d'Ypq est régulée par la lysine du milieu de croissance.

Les levuristes ont ensuite recherché des indices sur la fonction de ces protéines. Dans le cas d'Ypq3, des études transcriptomiques suggéraient que son gène appartienne au régulon « lysine » (gènes régulés par la présence de lysine). L'expression du gène *ypq3* a été quantifiée par association de son promoteur au gène rapporteur *lacZ* dans des conditions de croissance riches ou pauvres en lysine. Elisa Llinares et Bruno André ont montré que le gène *ypq3* s'exprime plus

fortement en absence de lysine et des expériences complémentaires ont montré que cette régulation utilise le même mécanisme que celle des gènes de la voie de biosynthèse de la lysine. Ypq3 participerait donc comme ces enzymes à l'approvisionnement du compartiment cytosolique en lysine. Compte tenu de sa localisation intracellulaire, E. Llinares et B. André ont donc émis l'hypothèse qu'Ypq3 exporte la lysine de la vacuole.

### **1.2.3 - Les levures mutantes pour Ypq1 et Ypq2 résistent à un analogue toxique de l'arginine.**

Dans le cas d'Ypq1 et Ypq2, les bases de données transcriptomiques ne fournissaient aucun indice. Pour tester l'hypothèse plus générale d'un rôle des 3 protéines Ypq dans l'homéostasie des acides aminés basiques, E. Llinares et B. André ont entrepris une analyse phénotypique des gènes *ypq1*, *2* ou *3* en étudiant la croissance de levures mutantes en présence d'analogues toxiques de ces acides aminés, une approche couramment utilisée pour l'étude du métabolisme de la levure.

Parmi l'ensemble de tests réalisés, seul un analogue toxique de l'arginine, la canavanine, a un effet sur la croissance des levures mutantes *ypq1Δ* et *ypq2Δ*, sans effet détectable sur le mutant *ypq3Δ* : les levures *ypq1Δ* et *ypq2Δ* sont résistantes à des concentrations de canavanine auxquelles les levures sauvages ne poussent pas. Autrement dit, lorsqu'elles sont actives, les protéines Ypq1 et Ypq2 sensibilisent les levures vis-à-vis de la canavanine. A ce stade de l'étude, la raison pour laquelle elles induisent une sensibilisation n'est pas claire. En effet, on pouvait s'attendre à un effet contraire si les protéines Ypq1 et Ypq2 exportent

de l'arginine de la vacuole : l'accroissement de la concentration d'arginine dans le cytosol devrait entrer en compétition avec l'analogue toxique au niveau de sa cible cytosolique, l'arginyl-ARNt synthétase. Cette question sera rediscutée plus loin dans ce chapitre.

Quoiqu'il en soit, même si l'explication ne semblait pas évidente, ces analyses phénotypiques renforçaient le lien entre Ypq et l'homéostasie des acides aminés basiques. L'hypothèse la plus simple émergeant de ces travaux était donc celle d'un rôle des protéines Ypq1, 2 et 3 dans le transporteur des acides aminés à travers la membrane des vacuoles (peut-être spécifique de la lysine dans le cas d'Ypq3) et, par voie de conséquence, d'un rôle analogue de leur homologue de mammifère PQLC2 dans les lysosomes.

### 1.3 - Test de l'hypothèse des levuristes et caractérisation de la fonction de transport de PQLC2

#### **1.3.1 – Remarques préalables**

L'accessibilité réduite des lysosomes rend l'étude du transport lysosomal de métabolite techniquement difficile, d'autant plus que l'orientation physiologique de ces transports est le plus souvent dans le sens d'un efflux. Dans les années 80-90, une technique développée pour le cas des transports d'acides aminés a consisté à charger artificiellement les lysosomes à l'aide d'un ester d'acide aminé. Après entrée (probablement passive) de l'ester dans les organites, l'ester est préférentiellement hydrolysé dans les lysosomes, riches en hydrolases, ce qui permet de charger sélectivement les lysosomes en acide aminé dans des fractions

subcellulaires partiellement purifiées. L'addition de l'acide aminé radiomarqué à la suspension d'organites permet de mesurer une réaction d'échange membranaire entre l'acide aminé externe, radiomarqué, et celui préchargé dans les lysosomes. Cet échange est généralement stimulé par la forte concentration de l'acide aminé interne (réaction de « contre-transport »). En pratique, cette technique reste laborieuse et la quantification du transport n'est pas aussi précise que dans la situation, plus favorable, d'un transport à la membrane plasmique.

En 2001, mon laboratoire d'accueil et le groupe de Corinne Antignac ont développé une technique qui simplifie l'étude des transporteurs lysosomaux dans le cas des protéines recombinantes. Elle consiste à inactiver le ou les motifs responsables de la localisation lysosomale pour dérouter la protéine vers la membrane plasmique. Il suffit alors d'ajouter le substrat dans le milieu extracellulaire à pH acide pour mesurer une réaction de transport identique à l'efflux lysosomal (le milieu extracellulaire étant topologiquement équivalent à la lumière lysosomale). Les avantages de cette approche sont : 1) sa rapidité de mise en place une fois le(s) motif(s) de ciblage identifié(s) ; 2) l'utilisation d'un petit nombre de cellules, voire d'une cellule unique ; et 3) sa versatilité technique car le transport sur cellules entières peut être effectué non seulement à l'aide de molécules radiomarquées, mais aussi par enregistrement électrophysiologie ou à l'aide de sondes fluorescentes. L'inconvénient éventuel (jusqu'ici non observé) est que le transporteur lysosomal est étudié dans une membrane ectopique, ce qui peut altérer son activité. Cette technique a été appliquée par mon laboratoire

d'accueil et d'autres groupes pour plusieurs transporteurs lysosomaux (Sagné PNAS 2001, Kalatzis et Gasnier EMBO J 2001, Costa JPhysiol 2012, Neagoe JBiol.Chem. 2010).

En 2008, le groupe de Haoxing Xu a inauguré une nouvelle technique consistant à accroître le diamètre des lysosomes et endosomes tardifs à l'aide d'un agent pharmacologique (vacuoline-1) puis, après ouverture de la cellule, à enregistrer le courant d'un lysosome géant unique par la technique de patch-clamp. Cette technique a été appliquée à deux canaux ioniques du lysosome : la mucolipine (ou TRPML1) et les protéines TPC1 et TPC2 (Dong Nature 2008). Toutefois, son utilisation reste un tour de force nécessitant un savoir-faire spécialisé et elle semble plus difficilement applicable aux transporteurs secondaires, car ceux-ci sont considérablement plus lents que les canaux ioniques (5 à 7 ordres de grandeur). Les premiers sont donc beaucoup moins électrogéniques que les seconds.

Compte tenu de ces considérations et puisque j'avais déjà identifié le motif de ciblage lysosomal de PQLC2, l'approche sur cellules entières développée dans le laboratoire constituait une approche de choix.

### **1.3.2 – Test préliminaire du transport de PQLC2 sur cellules HEK-293, mesures de flux molécules radiomarquées (mesures biochimiques).**

Dans une première série d'expériences, j'ai exprimé PQLC2-LL/AA-EGFP dans des cellules HEK-293 et examiné leur capacité à se charger en [<sup>3</sup>H]L-arginine ([<sup>3</sup>H]Arg) ou [<sup>3</sup>H]L-lysine ([<sup>3</sup>H]Lys) dans un milieu extracellulaire acide. Après incubation avec la molécule radioactive, les cellules sont lavées rapidement



dans un milieu glacé (pour éviter d'inverser le transport) et comptées par scintillation liquide. Les comptages ont révélé dans plusieurs expériences une augmentation, significative mais faible, de la charge en acide aminé basique des cellules exprimant PQLC2 à leur surface (construction PQLC2-LL/AA-EGFP) par rapport aux cellules exprimant le PQLC2 sauvage ou aux cellules témoins non transfectées (figure 19).

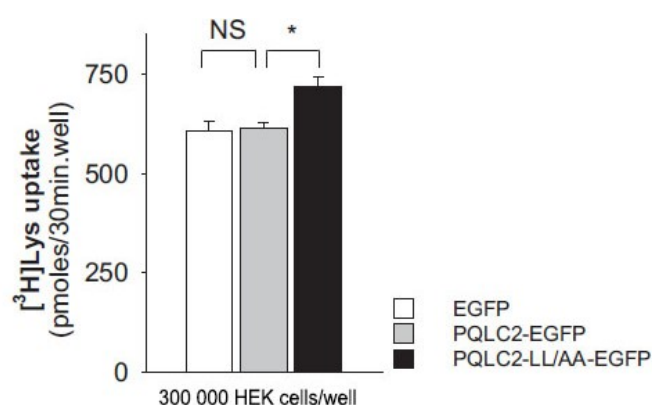


Figure 19. Chargement à pH5 en lysine radiomarquée des cellules HEK-293, transfectées par l'EGFP, PQLC2 sauvage (PQLC2-EGFP) ou adressé à la membrane plasmique de la cellule (PQLC2 LL/AA-EGFP). Les cellules HEK-293 présentant PQLC2 à leur surface semblent accumuler de manière préférentielle la lysine mais la faible différence rend l'expérience peu reproductible.

Néanmoins, ceci n'était valable que dans certaines expériences, le signal associé à PQLC2-LL/AA-EGFP était indétectable dans d'autres expériences. L'explication de ce demi-succès provient du fait que les lignées cellulaires accumulent très activement les acides aminés basiques. Le bruit de fond de nos expériences (transport endogène) est donc très élevé dans ce système cellulaire, ce qui réduit d'autant la sensibilité de détection de l'activité de PQLC2.

### **1.3.3 - Démonstration de l'activité de transport de PQLC2 sur ovocytes de xénopes**

#### **1.3.3. a) PQLC2-LL/AA est délocalisé à la membrane plasmique des ovocytes**

Nous avons donc décidé d'utiliser comme système alternatif d'expression les ovocytes de xénope car, contrairement aux cellules de mammifères, leur transport endogène d'acides aminés basiques à pH acide était faible. Afin d'exprimer efficacement les protéines PQLC2-WT-EGFP, PQLC2-LL/AA-EGFP ou, à titre de témoin négatif, l'EGFP seule dans les ovocytes, les séquences codantes ont été sous-clonées dans un vecteur adaptés à la synthèse in vitro d'ARN messagers synthétiques (ARNc), avec des séquences 5' et 3' non codantes qui stabilisent l'ARNc et augmentent le taux d'expression dans l'ovocyte de xénope. Les ARNc ont été injectés mécaniquement dans le cytosol des ovocytes. L'observation en microscopie à épifluorescence de l'étiquette EGFP montre bien une délocalisation de la protéine PQLC2-LL/AA-EGFP près de la surface des ovocytes, alors que la fluorescence est exclusivement intracellulaire et diffuse pour le PQLC2 sauvage et l'EGFP (figure 20). Les conditions étaient donc en place pour appliquer le protocole de mesures de transport sur cellules entières dans ce nouveau système d'expression.

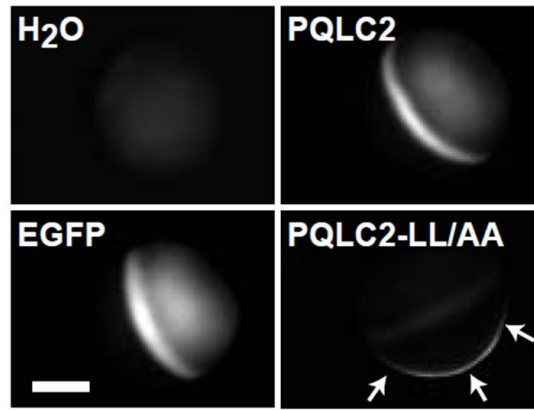


Figure 20. Acquisitions en épifluorescence des ovocytes injectés avec de l'eau (H<sub>2</sub>O) ou l'ARNc de l'EGFP (EGFP) , de PQLC2 sauvage ou muté sur le motif d'adressage LL/AA, tous deux étiquetés par l'EGFP. La fluorescence est nulle en condition H<sub>2</sub>O, diffuse dans les conditions EGFP et PQLC2 et enfin localisée à la membrane plasmique pour PQLC2-LL/AA.

### 1.3.3. b) Démonstration du transport de PQLC2 par mesures biochimiques

Après incubation des ovocytes pendant 20 minutes en milieu acide (pH 5,0), les ovocytes PQLC2-LL/AA-EGFP accumulent nettement l' [<sup>3</sup>H]Arg, l' [<sup>3</sup>H]Lys et la [<sup>3</sup>H]L-histidine ([<sup>3</sup>H]His) par rapport au niveau de base très faible observé dans les ovocytes exprimant seulement l'EGFP (figure 21). En revanche, l'accumulation d'acide aminé est indétectable dans les ovocytes exprimant PQLC2 sauvage, ce qui démontre que l'activité de transport est bien associée à la présence de PQLC2 à la surface cellulaire.

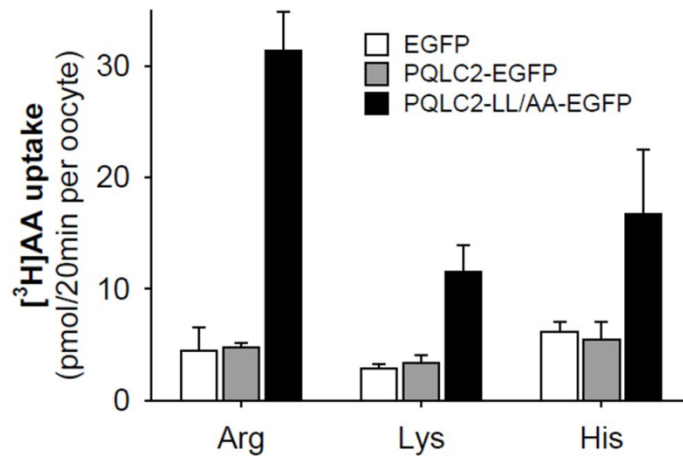


Figure 21. Test du transport par PQLC2 des acides aminés basiques radiomarqués dans les ovocytes de Xénopes. En conditions extracellulaires acides, l'arginine, la lysine et l'histidine s'accumulent préférentiellement dans le cytosol lorsque PQLC2 est à la membrane plasmique (noir) comparativement aux conditions témoins (EGFP et PQLC2-EGFP).

Par conséquent, l'hypothèse des levuristes d'un rôle de transport membranaire d'acides aminés basiques était juste, avec très probablement une conservation de cette fonction dans l'ensemble des eucaryotes, depuis la levure jusqu'à l'homme. Ce point étant acquis, j'ai caractérisé en détail l'activité de transport de PQLC2.

### 1.3.3. c) Caractérisation biochimique de l'activité de PQLC2.

L'accumulation de [3H]Arg dans les ovocytes PQLC2-LL/AA-EGFP s'accroît au cours du temps et reste linéaire durant les 10 premières minutes (figure 22), ce qui permet de définir la durée maximale en deçà de laquelle on peut remplacer les mesures de *vitesse* de transport (plus rigoureuses, mais plus fastidieuses et chères) par des mesures d'accumulation à un temps unique.

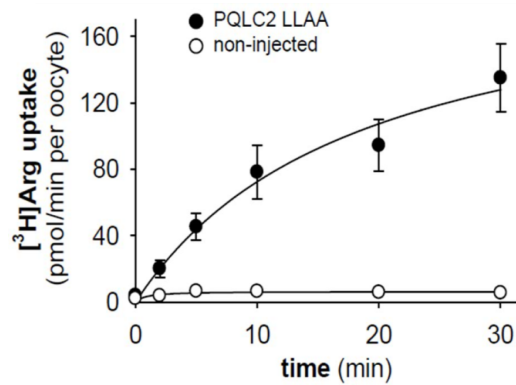


Figure 22. Test du transport au cours du temps de l'arginine radiomarquée sur des ovocytes PQLC2-LL/AA-EGFP (en noir) ou sans expression exogène (non-injecté en blanc). Le transport est linéaire les dix premières minutes pour atteindre un état d'équilibre après 30 minutes.

Le transport est très sensible au pH avec un transport très faible à pH7 (figure 23). Cette dépendance vis-à-vis d'un milieu acide sur la face luminale du transporteur est en accord avec sa localisation lysosomale. Les études de saturation ont montré que le transport de [3H]Arg par PQLC2 suit une cinétique Michaelienne, avec un  $K_m$  d'environ 3 mM (figure 24).

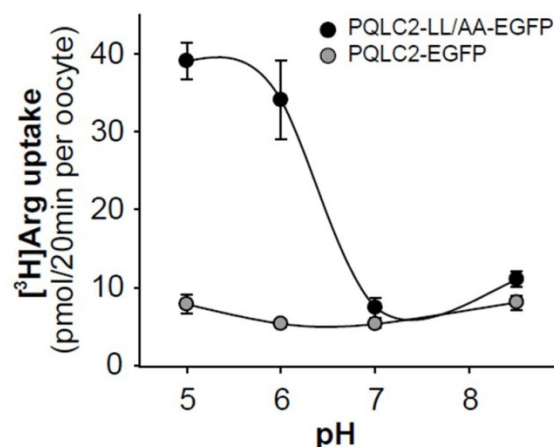


Figure 23. Dépendance au pH du transport de l'arginine par PQLC2 en mesures biochimiques. L'activité de PQLC2 décroît à partir du pH6 jusqu'à s'abolir pour des valeurs neutres ou basiques. Le transport endogène ne change pas en fonction du pH.

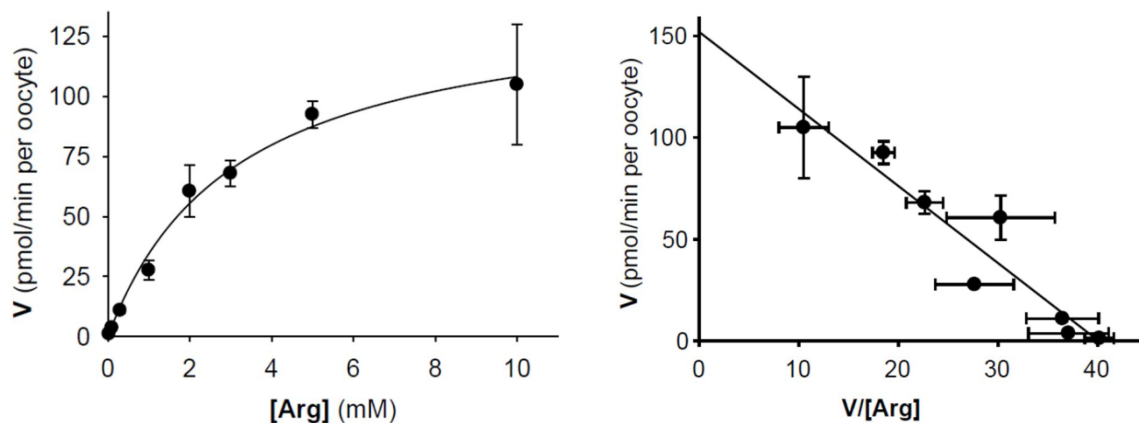


Figure 24. Courbe dose-réponse du transporteur par l'approche de traceur de flux radioactif en représentation Michaelis-Menten (à gauche) ou Eadie-Hofstee (à droite). La saturation du transporteur est atteinte à 10mM de substrat en milieu acide et les constantes de transport sont  $K_m = 3,8\text{mM}$  et  $V_{max} = 152\text{ pmol/min/ovocyte}$ .

Pour caractériser la sélectivité de substrat de PQLC2, j'ai appliqué des acides aminés non radiomarqués (10mM) en même temps que l'  $[^3H]Arg$  et mesuré l'inhibition du transport induite par la molécule « froide ». L'inhibition est observée exclusivement avec les acides aminés basiques (figure 25), ce qui démontre l'importance de la présence d'une charge positive sur la chaîne latérale à pH5 pour l'interaction avec PQLC2 (figure 26).

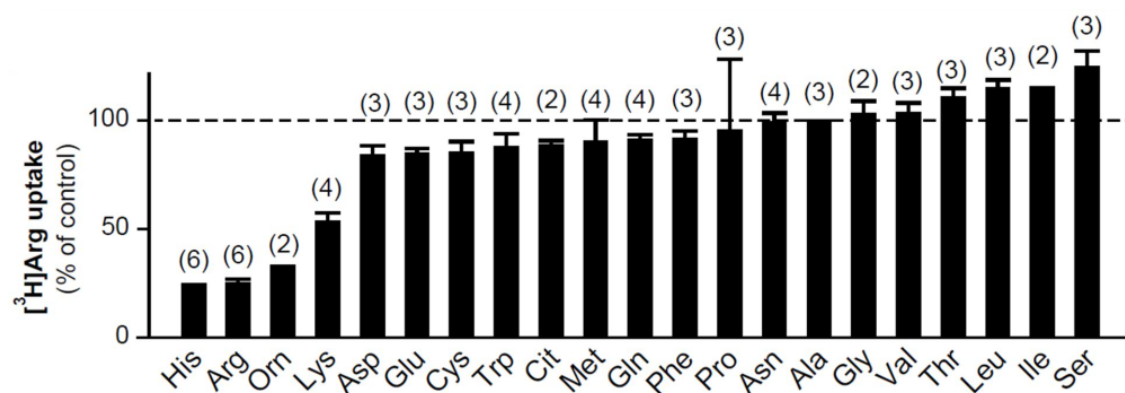


Figure 25. Transport résiduel de l'arginine radiomarquée après compétition avec chaque acide aminé à 10mM durant 20 minutes. Seuls les acides aminés basiques, à l'exclusion de la citrulline interagissent significativement avec PQLC2.

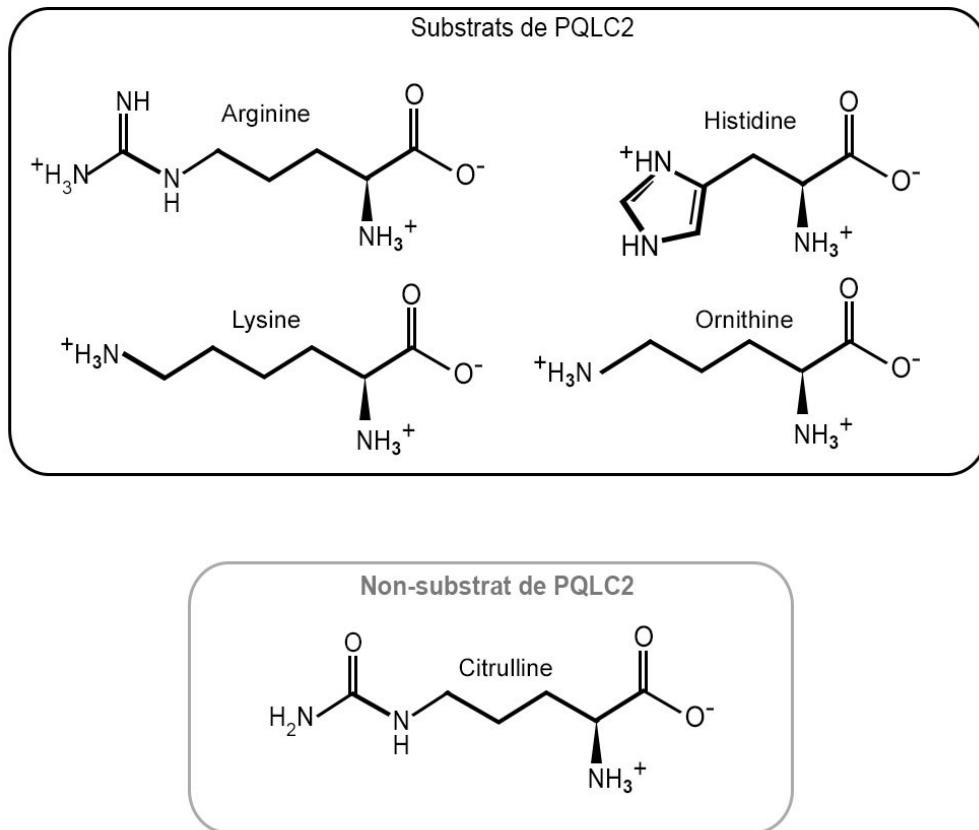


Figure 26. Acides aminés basiques à pH5. Seules les molécules chargées positivement sur leurs chaînes latérales sont substrat de PQLC2.

La conclusion globale de ces expériences est que PQLC2 est un transporteur sélectif des acides aminés basiques activé par l'environnement acide du lysosome.

#### 1.3.3. d) Démonstration du transport de PQLC2 par mesures électrophysiologiques.

L'utilisation des ovocytes de xénope a l'avantage de permettre de suivre l'activité des transporteurs par mesure de courants électriques. En exprimant le transporteur dans la membrane plasmique de l'ovocyte avec une densité

suffisamment forte ( $10^{10}$  à  $10^{11}$  molécules de transporteur par ovocyte), il est possible de mesurer des courants de transport suffisamment fiables (centaines, voire millier de nA). Cette technique électrophysiologique a essentiellement deux avantages par rapport aux mesures biochimiques : d'une part, l'accès aux molécules de substrats non disponibles sous forme radiomarquée et, d'autre part, la possibilité de disséquer finement le mécanisme de transport grâce au contrôle du potentiel de membrane, un paramètre important, par la technique de voltage imposé (*voltage clamp*) et à la haute résolution temporelle des mesures. C'est le premier avantage qui a motivé l'utilisation de cette technique dans le cadre de ma thèse.

Les acides aminés basiques étant chargés positivement dans les conditions de nos expériences, nous nous attendions à ce que l'activité de PQLC2 soit électrogénique (seul un co-transport d'anion monovalent ou un échange contre un autre cation monovalent pourrait rendre le transport électroneutre).

J'ai donc appliqué des acides aminés à 10mM et pH 5 sur des ovocytes dont le potentiel membranaire était imposé à -40mV et enregistré les courants évoqués par ces molécules (figure 27).



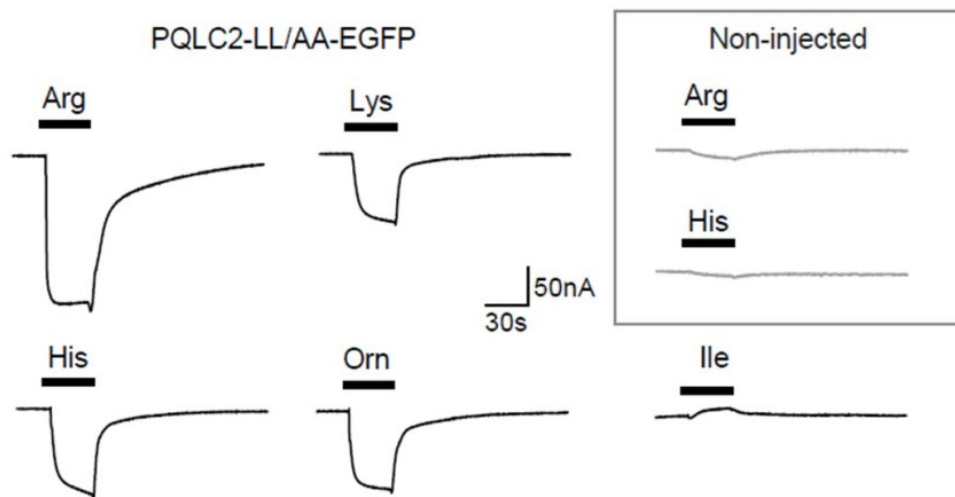


Figure 27. Test électrophysiologique du courant évoqué par différents acides aminés à 10mM dans un milieu extracellulaire à pH5 sur des ovocytes PQLC2-LL/AA (en noir) et non injectés (en gris) clampés à  $-40\text{mV}$ . Seuls les acides aminés basiques induisent un robuste courant entrant dans la condition PQLC2 LL/AA tandis que le courant endogène pour les mêmes composés n'est presque pas décelable.

Ces expériences ont montré que les acides aminés basiques induisent un courant entrant (entrée de charges positives) dans des ovocytes PQLC2-LL/AA-EGFP, mais pas dans des ovocytes témoins n'exprimant pas le transporteur. Le transport des substrats de PQLC2 entraîne donc un passage de charge à travers la membrane.

La stœchiométrie de transport, c'est-à-dire l'association ou non des acides aminés basiques avec le passage d'ions inorganiques ou d'autres molécules, est encore inconnue. Néanmoins, des expériences en cours, associant radioactivité et électrophysiologie sur les mêmes ovocytes, réalisées par Xavier Leray (doctorant) et B.Gasnier, semblent montrer que le courant est exclusivement porté par la charge de l'acide aminé basique. PQLC2 ne serait donc pas couplé aux protons

(bien que ceux-ci accélèrent sa vitesse), contrairement aux autres transporteurs lysosomiaux caractérisés jusqu'ici.

### 1.3.3. e) Caractérisation électrophysiologique de l'activité de PQLC2.

Disposant ainsi d'une nouvelle technique de mesure de l'activité de PQLC2, j'ai caractérisé à nouveau cette activité. Ces mesures électrophysiologiques ont confirmé la sélectivité de PQLC2 vis-à-vis de la charge positive de la chaîne latérale car seuls les acides aminés cationiques induisent un courant. Aucun autre acide aminé n'induit de courant dans quelque condition que ce soit. De plus, l'ornithine, chargée positivement, est non seulement reconnue (mesures biochimiques), mais elle est aussi transportée car elle induit un courant de transport alors que son analogue neutre, la citrulline, n'induit pas de courant en accord avec l'absence d'interaction dans les mesures biochimiques (figure 28)

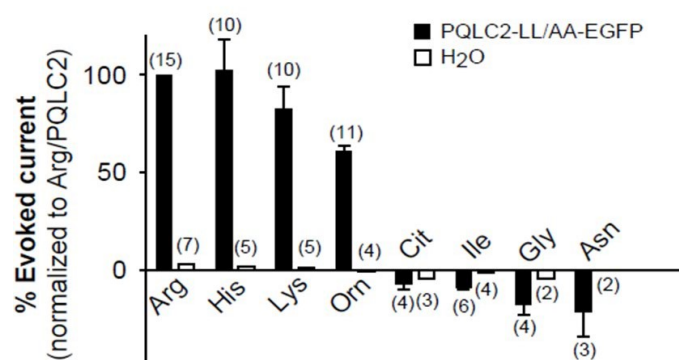


Figure 28. Histogramme de la moyenne de l'ensemble des mesures électrophysiologiques (n entre parenthèse) effectuées pour un seul acide aminé sur des ovocytes PQLC2LL/AA ou injectés à l'eau (H2O).

La dépendance du courant vis-à-vis de la concentration d'arginine montre à nouveau une cinétique Michaelienne, avec un  $K_m$  de 2 mM en très bon accord avec les mesures biochimiques (figure 29). Enfin, la dépendance vis-à-vis du pH extracellulaire (équivalent du pH intralysosomal) montre une forte activation à pH acide avec une activité significative mais très faible à pH 7 (figure 30).

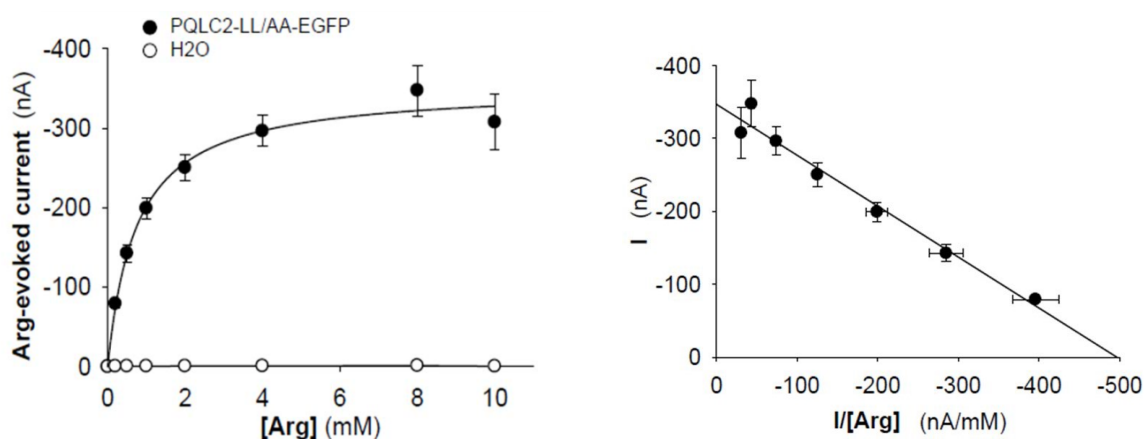


Figure 29. Caractérisation électrophysiologique de la courbe dose-réponse du transporteur en représentation Michaelis-Menten (à gauche) ou Eadie-Hofstee (à droite). La saturation du transporteur semble atteinte à environ 8mM de substrat en milieu acide et les constantes de transport avec  $K_m = 2,49$  mM, du même ordre qu'en biochimie et  $I_{max} = -110$  pmol/min/ovocyte.

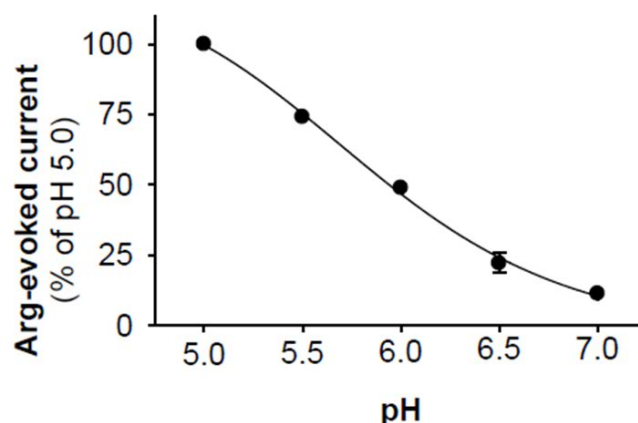


Figure 30. Dépendance au pH du transport de l'arginine par PQLC2 en mesures électrophysiologiques. PQLC2 perd de son activité lorsque le pH augmente ; il est inactif à pH neutre.

En conclusion, deux techniques différentes établissent de manière très concordante que PQLC2 est un transporteur sélectif d'acides aminés cationiques activé par un pH acide extracytosolique.

## 2 – Conservation de la fonction chez la levure et origine du phénotype

### « canavanine »

Cette fonction de transport des acides aminés basiques par PQLC2 est-elle conservée chez ses homologues fongiques ? Pour répondre à cette question, j'ai essayé de mettre en place le même type d'expérience pour les protéines de levure. Malheureusement, l'expression des protéines Ypq (protéines sauvages ou mutants du trafic) dans les ovocytes n'était pas suffisante pour effectuer des mesures similaires à celles réalisées avec PQLC2. La preuve directe de leur fonction de transport dans ce système étant impossible, nos partenaires généticiens ont adopté une stratégie réciproque d'expression de PQLC2 chez la levure pour démontrer l'équivalence fonctionnelle entre PQLC2 et les protéines Ypq.

### 2.1 - Orthologie entre Ypq2 et PQLC2

Comme nous l'avons vu précédemment, la délétion des gènes *ypq1* ou *ypq2* chez la levure induit une résistance à la canavanine. Ainsi, l'expression de PQLC2-WT-EGFP dans ces levures pourrait rétablir la sensibilité au toxique s'il existe une équivalence fonctionnelle entre Ypq1 ou Ypq2 et PQLC2. Dans le cas

d'Ypq3, la question n'a pas pu être abordée, en l'absence de phénotype identifié associé au gène *ypq3*.

Nos collaborateurs ont d'abord examiné si PQLC2-WT-EGFP<sub>est</sub> acheminé à la vacuole fongique, ce qui était loin d'être évident car le motif dileucine identifié chez PQLC2 n'est pas conservé chez la levure. Toutefois nous avons montré que le PQLC2 de rat est localisé à la membrane vacuolaire après expression hétérologue (figure 31A). Ceci peut s'expliquer par la conservation des machineries de trafic intracellulaire des protéines chez les eucaryotes : même si les protéines Ypq n'utilisent pas le même motif que PQLC2, d'autres protéines vacuolaires de levure sont acheminées grâce à un motif dileucine.

Les conditions étaient donc réunies pour effectuer des expériences de complémentation fonctionnelle sur le phénotype de croissance en présence de canavanine. Ces expériences ont révélé que PQLC2 restaure la sensibilité à la canavanine lorsqu'on l'exprime dans des levures *ypq2Δ* (choisies en raison de leur phénotype plus marqué que le mutant *ypq1Δ*). L'expression hétérologue de PQLC2 semble même plus efficace que la complémentation fonctionnelle homologue par un plasmide exprimant Ypq2 (figure 31B).

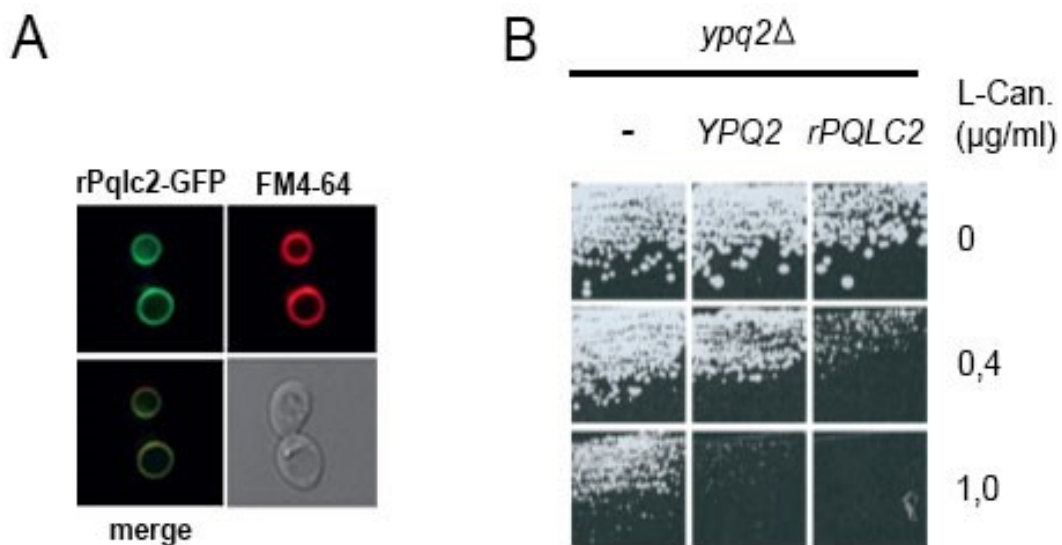


Figure 31. A) Expression de PQLC2 étiqueté avec la protéine EGFP dans les levures (rPqlc2-GFP) et coloration de la vacuole au FM4-64 (en haut à droite). Les deux émissions se superposent (« merge » en bas à gauche) montrant l'adressage de PQLC2 à la membrane vacuolaire de la levure. B) Test de complémentation fonctionnelle d'YPQ2 par PQLC2. La suppression de la résistance à la canavanine du phénotype des levures n'exprimant pas YPQ2 (colonne de gauche) est visible dès 0,4 µg/ml de toxique (ligne du milieu) et ce, après expression exogène de PQLC2 (colonne de droite). La sensibilité est même exacerbée pour PQLC2 en comparaison avec l'expression exogène de la protéine YPQ2 de levure (colonne centrale)

## 2.2 – Explication du phénotype « canavanine »

La sensibilisation des levures à la canavanine par PQLC2 est cependant paradoxale car si PQLC2 exporte l'arginine de la vacuole, comme on peut s'y attendre compte tenu de nos expériences de transport, l'arginine ainsi exportée devrait entrer en compétition avec la canavanine cytosolique au niveau de l'arginyl-ARNt synthétase et diminuer ainsi sa toxicité. Pourquoi observe-t-on l'inverse ?

Il manque donc une pièce du puzzle. Par contre, cela pourrait s'expliquer si le toxique était stocké dans la vacuole par un mécanisme de résistance par exemple. Les transporteurs Vba sont connus pour importer des acides aminés basiques et peut être donc la canavanine (Shimazu J.BiolChem 2005). Ainsi, si PQLC2 (ainsi que les protéines Ypq1 et Ypq2) transportent aussi la canavanine, l'activité de PQLC2, ou de Ypq1 et Ypq2, aurait simultanément des effets opposés sur le phénotype de croissance en présence du toxique selon le substrat transporté : l'export vacuolaire d'arginine contribuera à diminuer la toxicité de la canavanine mais, d'un autre côté, l'export vacuolaire de canavanine, contribuera à accentuer la toxicité. Le fait que le second effet l'emporte sur le premier pourrait traduire un rapport des flux canavanine/Arg à travers PQLC2 (ou Ypq1, 2) plus élevé qu'au niveau des étapes d'entrée des deux composés dans la cellule à travers la membrane plasmique et de leur séquestration dans la vacuole. Si c'est le cas, PQLC2 élèvera le rapport canavanine/Arg dans le cytosol, avec un effet net pro-toxique (figure 33).

Afin d'évaluer cette pièce manquante du puzzle, j'ai examiné si PQLC2 est capable de transporter la canavanine.

### **2.2.1 - Transport de la canavanine par PQLC2**

De la même manière que pour les acides aminés basiques protéinogéniques, j'ai appliqué la canavanine sur des ovocytes PQLC2LL/AA-EGFP à - 40mV et pH 5,0. Comme le rapport entre les flux de l'arginine et de son analogue toxique joue un rôle crucial dans l'explication suggérée ci-dessus, j'ai appliqué

séquentiellement la canavanine, mais aussi de l'arginine, sur chaque ovocyte, en prenant soin de varier l'ordre d'application d'une cellule à l'autre. Ces expériences ont révélé que la canavanine évoque un courant de transport dans les ovocytes PQLC2LL/AA-EGFP, avec des intensités comparables à celles induites par l'arginine pour toute une gamme de concentration (figure 32). La canavanine est donc bien transportée par PQLC2 et il s'agit d'un substrat très efficace car ses paramètres ( $K_M$ ,  $I_{max}$ ) sont comparables à ceux de l'arginine. PQLC2 est donc capable d'exporter efficacement la canavanine de la vacuole de levure dans l'expérience d'expression hétérologue.

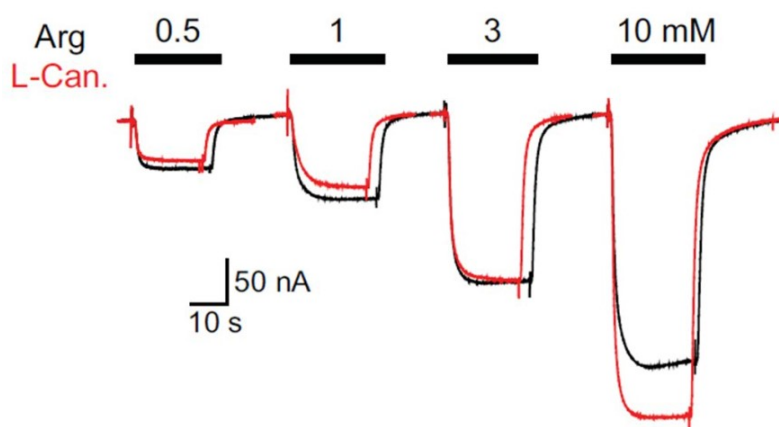


Figure 32. Juxtaposition des courants évoqués par l'arginine (en noir) ou par la canavanine (en rouge) dans des ovocytes PQLC2-LL/AA à différentes concentrations, pH extracellulaire de 5. La canavanine est transportée par PQLC2 de façon similaire à l'arginine pour l'ensemble de la gamme de concentration testée.

Ces expériences fournissent donc une explication plausible à l'effet sensibilisateur, plutôt que protecteur, de PQLC2 vis-à-vis de la canavanine. Pour expliquer complètement le phénotype des levures, il faudrait quantifier le transport relatif des deux composés au niveau de la membrane plasmique et du



système de séquestration vacuolaire et, dans le cas de l'arginine, prendre aussi compte la contribution de la biosynthèse (figure 33).

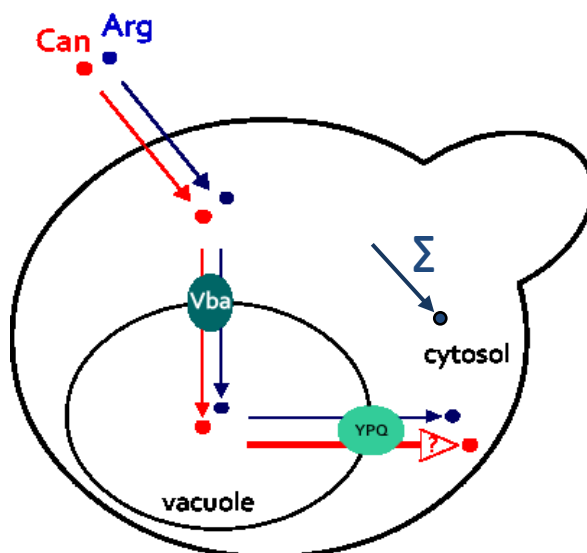


Figure 33. Schéma des apports et cheminements du composé naturel (arginine) ou toxique (canavanine) déterminant le ratio canavanine/arginine dans le cytosol. La canavanine et l'arginine du milieu sont transloquées dans le cytosol puis stockées dans la vacuole via les Vba pour être réincorporée dans le métabolisme cellulaire grâce aux transporteurs YPQ. La cinétique de chaque transport ainsi que la néosynthèse d'arginine ( $\Sigma$ ) déterminent le ratio toxique/arginine dans le cytosol et ainsi le pouvoir toxique du composé.

Pour ce qui concerne la séquestration vacuolaire, nos partenaires généticiens ont démontré que l'expression des protéines Vba1 Vba2 et Vba3, transporteur assurant l'influx des acides aminés basiques dans la vacuole des levures, est nécessaire à l'expression du phénotype « canavanine ».

Il est donc probable qu'elles soient responsables de la séquestration vacuolaire de la canavanine. Cependant, à notre connaissance, le transport de canavanine par ces protéines n'a pas été étudié.

### 3 - Rôle de PQLC2 dans la pharmacothérapie de la cystinose

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la cystinosine se caractérise par une accumulation lysosomale de cystine dans la plupart des tissus et elle est traitée de manière curative par la cystéamine, un composé sulfuré qui élimine la cystine des lysosomes en formant un disulfure mixte cystéine-cystéamine (MxD). La molécule néoformée, dont la structure est proche de la lysine (figure 34), peut ainsi sortir de l'organite par une voie secondaire décrite par Pisoni comme un transporteur lysosomal d'acides aminés basiques non identifié, dénommé historiquement « système c » (Pisoni J Biol Chem. 1985, Butler J Clin Invest 1984).

L'identification de PQLC2 comme transporteur lysosomal d'acides aminés cationiques nous a donc incités à examiner son rôle dans l'effet thérapeutique de la cystéamine. Il est utile de mentionner que le mode d'action supposé de la cystéamine reposait en fait sur un seul type d'expérience effectuée en 1985 et montrée ci-après :

**TABLE IV**  
*trans-Stimulation of L-[<sup>14</sup>C]lysine exodus from normal and cystinotic human fibroblast lysosomal preparations by the mixed disulfide of L-cysteine and cysteamine at 25 °C and pH 6.5*

Isolated lysosomal fraction from either normal (Experiment A) or cystinotic (Experiment B) human fibroblasts was loaded with 0.061 mM L-[<sup>14</sup>C]lysine methyl ester as described under "Experimental Procedures." Exodus of L-[<sup>14</sup>C]lysine from lysosomes was measured at intervals of 3 min at 25°C in MST pH 6.5 buffer containing the indicated amino acid at the concentration shown in parentheses. Half-time values were determined by a linear regression analysis of the semi-logarithmic plots as described under "Experimental Procedures."

Compound	<i>t</i> <sub>1/2</sub>
<b>Experiment A: normal</b>	
Buffer (50 mM MOPS, 0.25 M sucrose, pH 6.5)	24.6
L-Cystine (0.5 mM)	22.3
2-Aminoethyl-L-cysteine (2 mM)	9.7
Mixed disulfide of L-cysteine and cysteamine (2 mM)	13.6
L-Lysine (2 mM)	8.7
<b>Experiment B: cystinotic</b>	
Buffer (50 mM MOPS, 0.25 M sucrose, pH 6.5)	25.6
L-Cystine (0.5 mM)	24.7
2-Aminoethyl-L-cysteine (2 mM)	14.7
Mixed disulfide of L-cysteine and cysteamine (2 mM)	14.7
L-Lysine (2 mM)	14.2

Figure 34. Capacité du MxD à accélérer l'efflux lysosomal de lysine préchargée dans les lysosomes.

Tester l'effet de PQLC2 dans la déplétion de cystine permettrait donc de mettre à l'épreuve ce modèle peu documenté expérimentalement bien que largement admis dans la communauté scientifique.

### 3.1 - Identité de PQLC2 avec le système c

Le transport lysosomal endogène des acides aminés cationiques (baptisé « système c ») a été décrit par Pisoni et coll. il y a environ 30 ans sur des fractions subcellulaires enrichies en lysosomes de fibroblastes humains en utilisant la technique de contre-transport mentionnée précédemment. Dans l'une de ces études le système c lysosomal a été comparé au transporteur des acides aminés cationiques de la membrane plasmique, non identifié à l'époque et baptisé « système y<sup>+</sup> » (Pisoni J Biol Chem 1987). Les mesures de transport effectuées sur les fractions lysosomales et des cellules entières ont révélé qu'il s'agit de transporteurs distincts puisque quelques composés agissent différemment sur le système c et le système y<sup>+</sup>. Le système lysosomal a une moins bonne affinité pour l'arginine, mais une meilleure affinité pour deux composés synthétiques, la N- $\alpha$ -méthyl-L-arginine (NaMe-Arg) et la  $\epsilon$ -N-triméthyl-L-lysine (3Me-Lys), par rapport à celui de la membrane plasmique.

J'ai donc testé l'effet de ces deux composés sur PQLC2 et sur CAT1, le transporteur du système y<sup>+</sup> dans la majorité des types cellulaires par compétition du transport d'arginine radioactive dans des ovocytes de xénopes. Les résultats montrent que PQLC2 a une moins bonne affinité pour l'arginine, mais une meilleure affinité pour la NaMe-Arg et la 3Me-Lys que CAT1, en accord avec les données de Pisoni et coll. (figure 35).

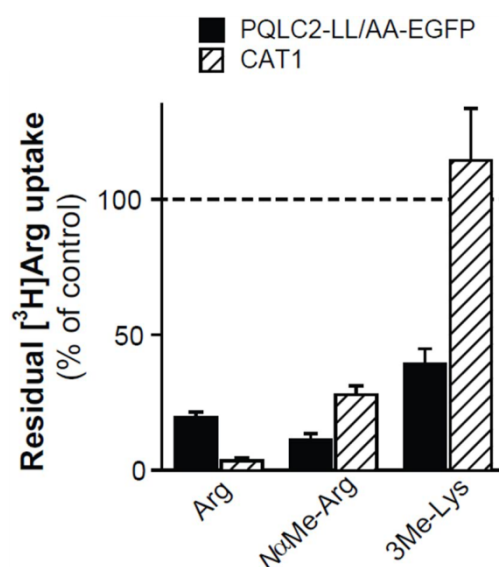


Figure 35. Transport résiduel de PQLC2 ou CAT1 à la surface de l'ovocyte, d'arginine radiomarquée après compétition avec 10mM d'arginine froide ou des composés méthylés qui discriminent le système y+ (CAT1) du système c. L'affinité de PQLC2, en comparaison avec CAT1, est plus faible pour l'arginine et plus forte pour les deux composés méthylés comme prédit pour le système c.

PQLC2 ressemble donc au système c décrit antérieurement sur des fractions de lysosome.

### 3.2 - PQLC2 transporte le disulfure mixte

Cette étape franchie, j'ai examiné si PQLC2 transporte le MxD. Comme celui-ci n'est pas disponible sous forme radioactive, la technique électrophysiologique était la méthode de choix pour répondre à cette question.

#### **3.2.1 – Mesures biochimiques préliminaires**

Le laboratoire a fait synthétiser à façon le MxD. J'ai d'abord effectué des expériences de compétition, moins consommatrices en produit que l'approche électrophysiologique. A 10mM, le MxD inhibe très efficacement le transport de

[<sup>3</sup>H]Arg par PQLC2, ce qui montre qu'il est reconnu par PQLC2 aussi bien que ses substrats naturels (figure 36).

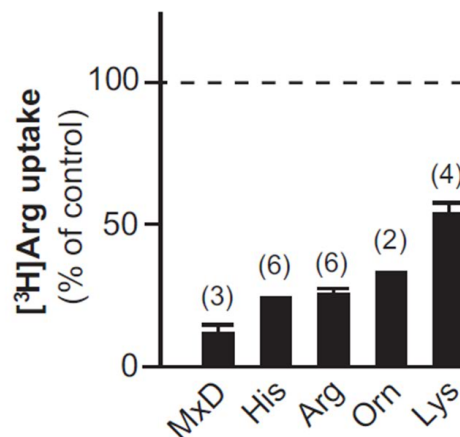


Figure 36. Transport résiduel d'arginine radiomarquée après compétition avec 10mM de disulfure mixte ou bien d'acides aminés basiques froids dans des ovocytes exprimant PQLC2. L'inhibition du transport de l'arginine par le MxD est au moins aussi importante que celle des substrats du transporteur.

### 3.2.1 – Mesures électrophysiologiques

J'ai donc perfusé le MxD sur des ovocytes PQLC2-LL/AA-EGFP enregistrés en voltage clamp et observé un courant entrant d'intensité comparable à celui produit par l'arginine (figure37). Le MxD est donc bien transporté par PQLC2.

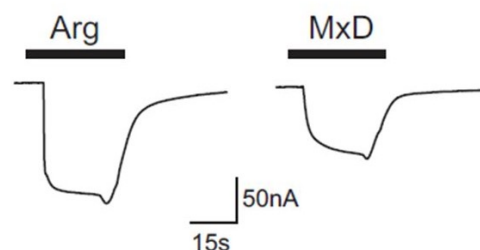


Figure 37. Test électrophysiologique du transport du disulfure mixte (MxD) en comparaison avec celui de l'arginine à 10mM en milieu extracellulaire acide, sur le même ovocyte PQLC2-LL/AA (-40mV). Le MxD évoque un courant plus faible que l'arginine, mais comparable à celui d'autres substrats.

Pour mieux caractériser le transport de MxD, j'ai appliqué des concentrations croissantes de MxD ou d'arginine à pH5 sur les mêmes ovocytes. Les résultats indiquent que le disulfure mixte est transporté aussi rapidement que l'arginine avec une affinité seulement deux fois moins importante (figure 38).

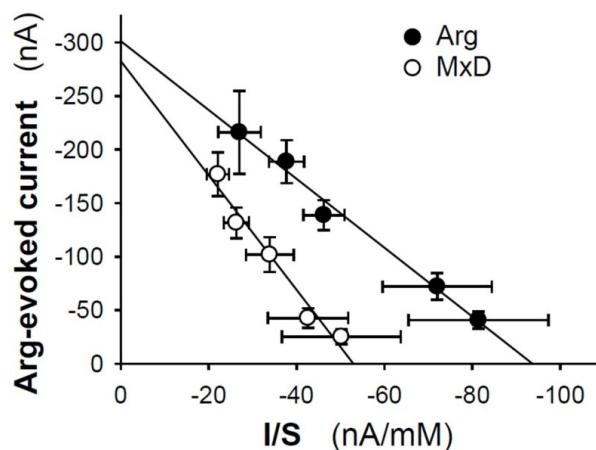


Figure 38. Représentation Eadie-Hofstee de l'ensemble des ovocytes testés électrophysiologiquement pour le transport de l'arginine (en noir) et pour le disulfure mixte (en blanc) à des concentrations extracellulaires différentes à pH5.

PQLC2 pourrait donc bien être responsable de l'effet décrit par Pisoni et coll. en 1985, qui a donné naissance au modèle de déplétion de la cystine des lysosomes de patients par la cystéamine. Pour démontrer ce point nous avons altéré l'expression de PQLC2 dans des cellules par interférence d'ARN.

### 3.3 - Rôle de PQLC2 dans l'effet thérapeutique de la cystéamine

Afin d'évaluer le rôle de PQLC2 dans le traitement de la cystinose, nous avons entrepris des expériences de silencing du gène PQLC2 sur des fibroblastes de patients cystinotiques traités à la cystéamine. Si le modèle est vrai, on peut

s'attendre à ce que la baisse d'expression de PQLC2 entraîne une accumulation du MxD dans les cellules de patients traitées par la cystéamine (figure 39).

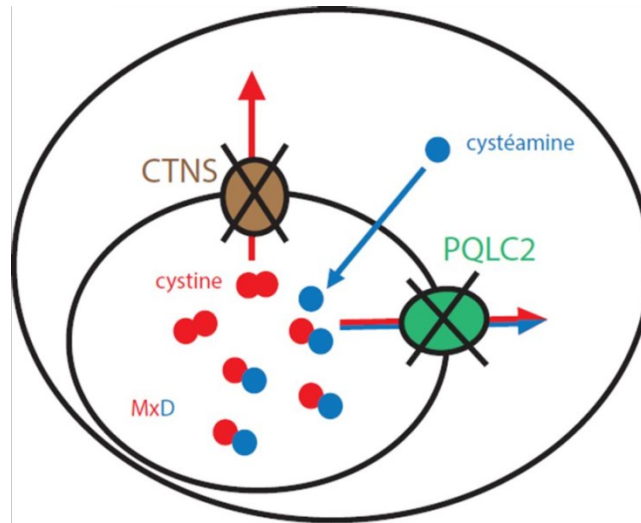


Figure 39. Schéma explicatif du test de quantification du MxD après silencing de PQLC2 sur des fibroblastes de patients cystinotiques traités à la cystéamine. La cystine accumulée dans le lysosome est convertie en MxD par la cystéamine lysosomale. Le MxD peut s'accumuler dans le lysosome si PQLC2 est limitant dans le traitement.

Ces expériences ont été réalisées dans notre laboratoire par Christine Anne, avec l'aide de Seana O'Reagan pour la mise au point du silencing. Les dosages de cystine et de MxD par spectrométrie de masse ont été effectués (et mis au point dans le cas du MxD) par Bernadette Chadeaux-Vekemans et ses collaborateurs à l'Hopital Necker. Les fibroblastes humains ont été généreusement fournis par Corinne Antignac. Ma participation à cette étape a été limitée, mais il me paraît utile de relater ces expériences dans mon mémoire car elles constituent le « point d'orgue » de l'identification et de la caractérisation de PQLC2.

### 3.3.1 - Mise au point et validation du silencing de PQLC2

Christine et Seana ont identifié deux si-ARNs distincts (n° 18 et 19) dirigés contre le PQCL2 humain et mis au point un protocole de transfection qui permet d'abaisser de 70 à 90% le niveau d'ARNm de PQLC2 (figure 40). Les protéines PQLC2 néo-synthétisées sont donc réduites de manière conséquente. La transfection a été mise au point dans des conditions de croissance cellulaire afin de limiter l'impact du pool initial de PQLC2 au cas où le renouvellement de la protéine PQLC2 soit très lent.

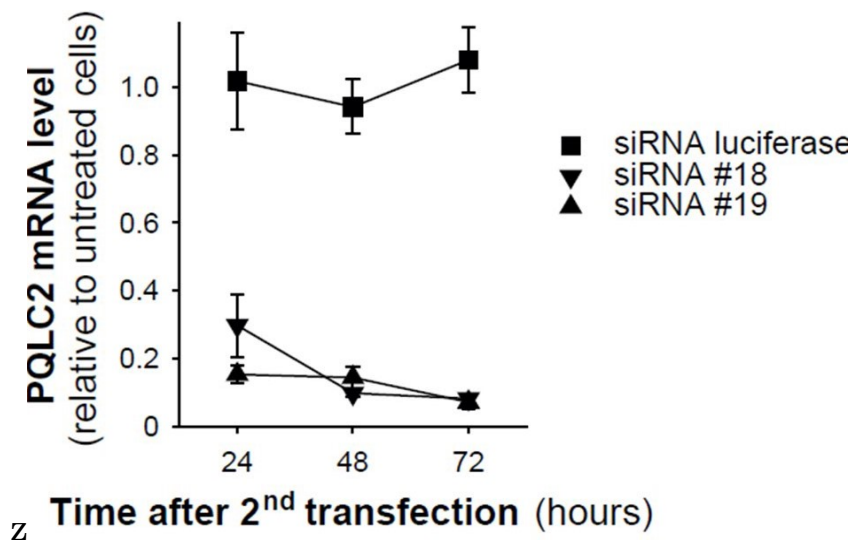


Figure 40. Quantification par qRT-PCR des ARNm de PQLC2 après deux transfections de fibroblastes "normaux" avec les siRNA anti-PQLC2 n°18, n°19 ou anti-luciférase. Les siRNA ciblant PQLC2 permettent de réduire efficacement le taux résiduel d'ARNm, de 70 à 90% (représentations triangulaires) en comparaison à celui des fibroblastes de même lignée, transfectés avec un siRNA anti-luciférase

Malheureusement, aucun anticorps anti-PQLC2 n'était disponible pour détecter efficacement la protéine native et confirmer la baisse de celle-ci dans les cellules transfectées. Une alternative est d'évaluer la baisse d'activité du transporteur



dans les cellules. Christine et Bruno ont développé un moyen astucieux pour évaluer cette activité d'efflux lysosomal *in situ* dans des cellules intactes.

Les fibroblastes ont été préincubés avec du méthyl ester de L-[<sup>3</sup>H]lysine ([<sup>3</sup>H]LysOMe; synthétisé à façon pour un projet antérieur), de manière à charger artificiellement les lysosomes en acide aminé avant une période de chasse sans ester. L'ester passe les membranes cellulaires et est converti majoritairement en [<sup>3</sup>H]Lys dans les lysosomes du fait de la forte activité estérase qui y règne (figure 41).

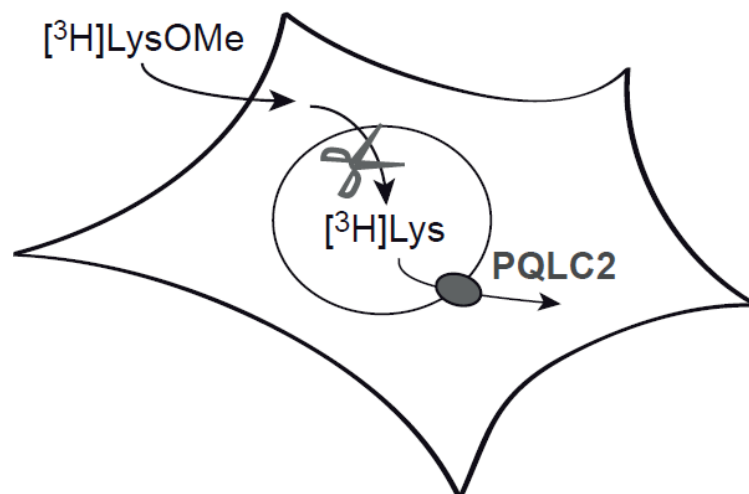


Figure 41. Schéma explicatif du mécanisme de charge des lysosomes en [<sup>3</sup>H]Lys par l'intermédiaire de la lysine estérifiée radiomarquée [<sup>3</sup>H]LysOMe. Les fonctions esters de [<sup>3</sup>H]LysOMe permettent au composé de passer les membranes jusqu'au lysosome où elles sont clivées par les hydrolases acides pour constituer un pool de lysine radiomarquée dans l'organite. La [<sup>3</sup>H]Lys est ensuite éliminée du lysosome grâce à l'activité de PQLC2.

Le pool de  $[^3\text{H}]\text{Lys}$  dans les cellules, observable sélectivement par chromatographie sur couche mince des extraits cellulaires, a été utilisé comme signature du compartiment lysosomal (figure 42).

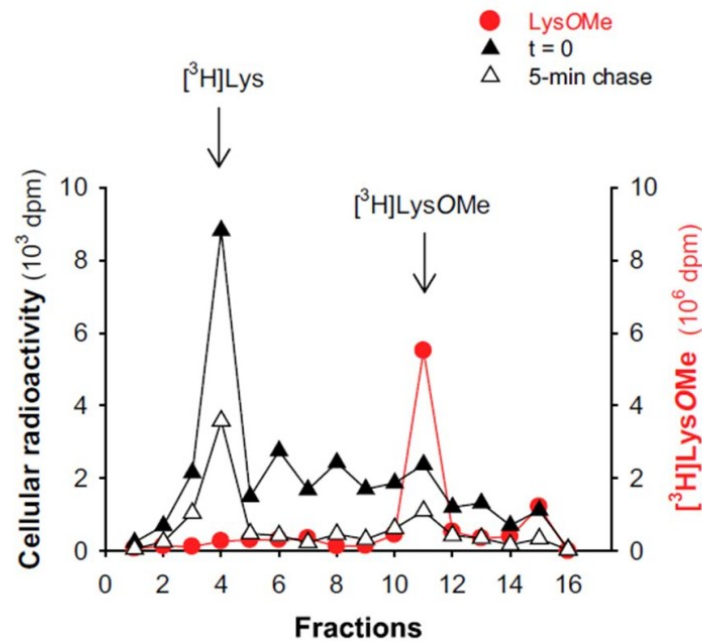


Figure 42. Chromatographie sur couche mince des extraits cellulaires de fibroblastes "normaux" après 2h d'incubation avec la lysine estérifiée radiomarquée ( $[^3\text{H}]\text{LysOMe}$ ). La conversion lysosomale du  $[^3\text{H}]\text{LysOMe}$  (fraction 11 triangle noir) en  $[^3\text{H}]\text{Lys}$  (fraction 4 rond rouge) est facilement détectable, et le pool lysosomal de lysine obtenu après incubation (triangle noir) est rapidement déplété de deux tiers après 5min (triangle blanc).

L'aire du pic de  $[^3\text{H}]\text{Lys}$  sur les chromatogrammes dépend de la vitesse d'entrée et de clivage de l'ester dans les lysosomes, mais aussi de l'activité d'efflux de PQLC2. Elle peut donc servir d'indice semi-quantitatif de l'activité de PQLC2. Lorsque ces mesures ont été effectuées sur les fibroblastes humains traités par les si-ARNs, on observe un doublement du pic de  $[^3\text{H}]\text{Lys}$ , ce qui démontre que le silencing a un impact significatif (mais partiel) sur le taux de renouvellement de PQLC2 (figure 43).

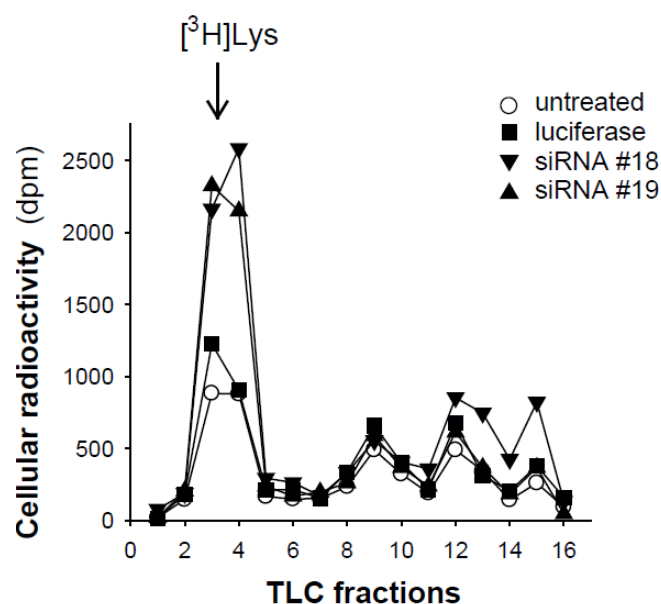


Figure 43. Chromatographie sur couche mince des extraits cellulaires de fibroblastes "normaux" traités au siRNA anti PQLC2 N°18 (triangle bas), n°19 (triangle haut) ou témoin (luciférase: carré et non traités: rond) pendant 4 jours et incubé pendant deux heures dans la lysine estérifiée radiomarquée ( $[^3\text{H}]\text{LysOMe}$ ). La lysine s'accumule dans les lysosomes (fraction 3 et 4) dès lors que PQLC2 est réprimé. Le silencing de PQLC2 est donc suffisant pour pouvoir apprécier son rôle dans la pharmacothérapie de la cystinose.

### 3.3.2 - Effet du silencing de PQLC2 sur l'efflux lysosomal de MxD

Le silencing étant mis au point et validé, Christine et nos collaborateurs ont pu évaluer l'impact de PQLC2 sur le traitement par la cystéamine en transfectant des cellules normales ou cystinotiques par les siARN dirigés contre hPQLC2(ou un siARN servant de témoin négatif) avant de les traiter par la cystéamine et de doser leur taux de cystine (figure 44) et de MxD par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à l'Hopital Necker. Ces expériences ont révélé une nette augmentation,

en moyenne de 7 à 15 fois, du MxD dans les cellules de patient traités par la cystéamine lorsque l'activité de PQLC2 est diminuée par les siARN (figure 45).

Pour une raison non encore étudiée, l'extinction de PQLC2 exacerbe le stockage de cystine dans les cellules cystinotiques (figure 44), mais cet effet reste limité (environ deux fois relativement aux cellules non traitées), et ne peut donc par rendre compte de l'augmentation du taux de MxD.

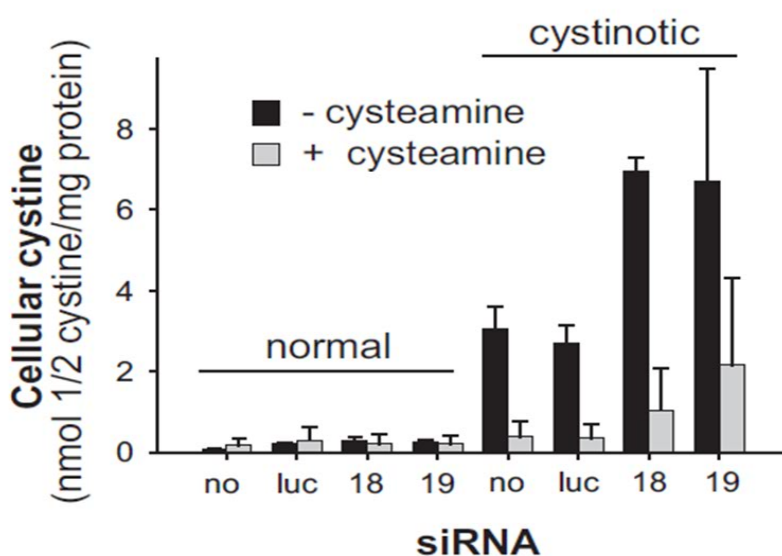


Figure 44. Analyse par spectrométrie de masse du taux de cystine dans les cellules "normales" (à gauche) ou cystinotiques (à droite), traitées ou non à la cystéamine (colonnes noires et grises, respectivement). Les cellules "normales" dans tous les cas n'accumulent pas la cystine. Hors traitement à la cystéamine, seules les cellules cystinotiques accumulent la cystine dans les lysosomes. Le traitement à la cystéamine permet la déplétion de la cystine accumulée dans les cellules cystinotiques.

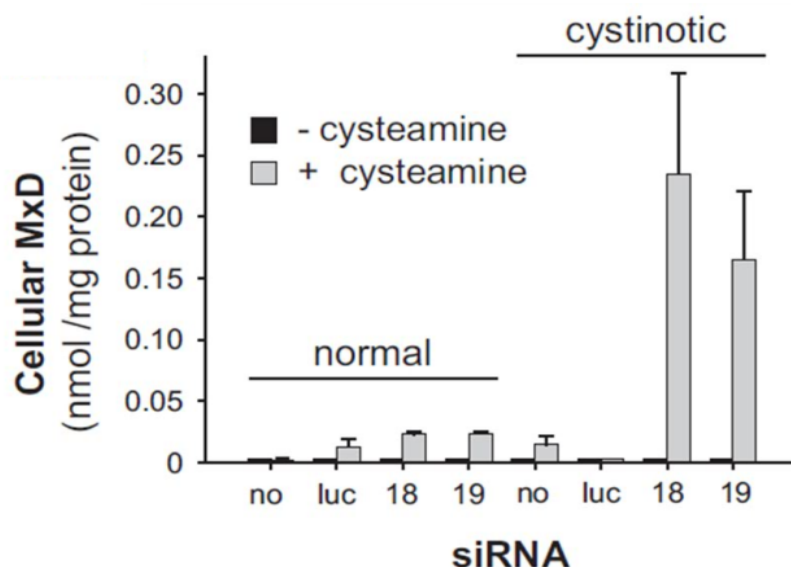


Figure 45. Analyse par spectrométrie de masse du taux de disulfure mixte (MxD) dans les cellules "normales" (à gauche) ou cystinotiques (à droite), traitées ou non à la cystéamine (colonnes noires et grises respectivement). Hors traitement à la cystéamine, le disulfure mixte n'est pas détectable dans les cellules. Le traitement des cellules cystinotiques à la cystéamine transforme la cystine lysosomale en MxD qui est confinée dans le lysosome lorsque l'activité de PQLC2 est réduite.

L'ensemble de ces résultats valident le modèle en cours de déplétion de la cystine lysosomale par la cystéamine et elles démontrent que PQLC2 est responsable de l'efflux lysosomal de MxD. PQLC2 joue donc un rôle majeur dans le traitement de la cystinose.

# **Chapitre 2**

## **Analyse bioinformatique**

### **des asymétries des protéines à motif PQ.**

#### 1 - Introduction

##### 1.1 – La famille à motif PQ: topologie et motif consensus

La famille PQ comporte désormais plus de deux transporteurs actifs secondaires. Les prédictions algorithmiques leurs prédisent une topologie à sept TMs comprenant une duplication de 3TMs. Celle-ci a pu être confirmée par Xiong Chen, ancien post-doctorant de mon laboratoire d'accueil, par SCAM (*substituted cysteine accessibility method*).

Son travail a consisté à vérifier l'accessibilité d'un réactif des thiols biotinylé, non perméant, à une cystéine introduite dans une version de la cystinosine dépourvue de cystéines endogènes et délocalisée à la membrane plasmique de l'ovocyte de Xénope.

En jouant sur les conditions d'incubation (ajout de détergent ou non) il a pu déterminer la répartition des résidus, cytosolique, membranaire ou extracytosolique, dans la protéine. Ses conclusions concordent avec les prédictions algorithmiques: 7TMs et une orientation N-terminale luminale et C-terminale cytosolique.

Il a aussi tiré parti du fait que la cystinosine dépourvue de cystéine endogène est toujours fonctionnelle pour analyser l'influence des résidus mutés en cystéine sur l'activité du transporteur par mesures électrophysiologiques.

Un fait majeur qui ressort de cette analyse fonctionnelle est l'absence quasi-totale de perte de fonction lorsque les mutations sont sur le TM4 central. Ce TM est constitué principalement d'acides aminés apolaires qui sont généralement considérés comme des résidus structuraux. Il ferait donc office de TM charnière entre les duplicats.

La duplication interne a été détectée principalement grâce au motif PQ. En dehors du motif, l'homologie de séquence entre membres de la famille PQ est très faible ce qui explique qu'aucune étude n'a pu regrouper ses membres par comparaison de séquence. Seuls des travaux recherchant des répétitions intra-protéiques ont pu mettre la lumière sur cette famille. L'alignement des domaines de 25 protéines eucaryotes (soit 50 séquences alignées), a permis de définir le motif dit "PQ" comme étant la séquence conservée à 75% dans cet alignement (Ponting GenRes 2001).

Le motif PQ, dont la fonction biologique est encore inconnue à ce jour, tient son nom du doublet de résidus adjacents proline-glutamine bien conservé qui est situé à l'interface membrane / cytosol des protéines. Ce doublet représente les deux premiers résidus d'un motif de huit acides aminés dispersés plus en aval dans la boucle cytosolique du domaine ainsi que dans le segment transmembranaire qui la suit (figure 46).

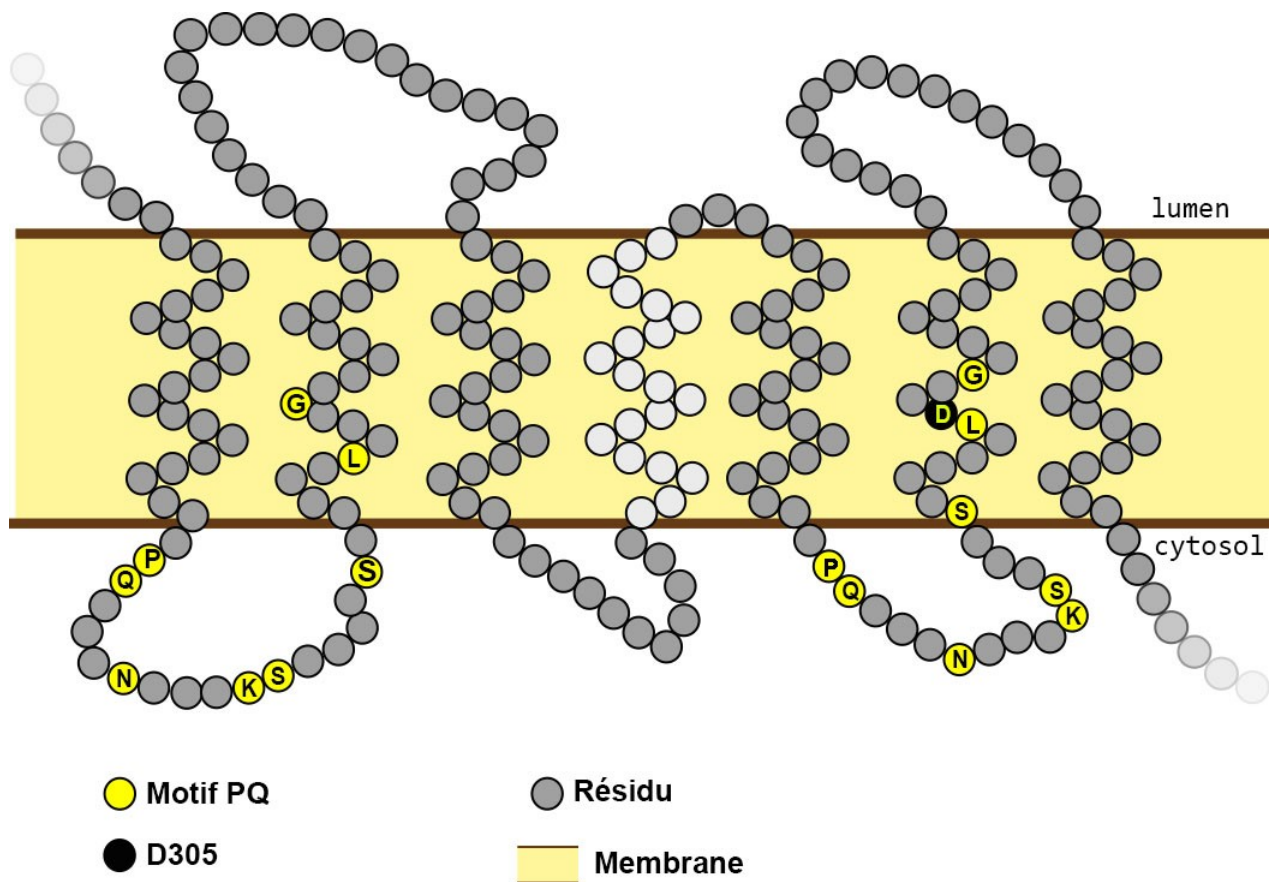


Figure 46. Topologie générale des protéines à motif PQ et position du D305 de la cystinosine. Les protéines à motif PQ sont constituées de deux duplicats de trois TMs (gris foncé) séparé par un TM charnière (gris clair). Les résidus du motif consensus PQ (fond jaune) sont dans la première boucle de chaque duplicat et dans le TM qui la suit. Le D305 responsable de la translocation d'un proton chez la cystinosine est en noir, situé dans la membrane. Il n'est pas conservé dans les autres protéines à motif PQ et ne fait pas partie du motif. Les domaines N et C terminaux ne sont pas représentés totalement.

**Les transporteurs identifiés de la famille PQ possèdent donc une topologie pseudo-symétrique commune 3-1-3 comprenant un motif consensus PQ dans chaque duplicat.**



## 1.2 - Rôle de la pseudo-symétrie et de l'asymétrie dans les transporteurs secondaires

La translocation du substrat est régie par un mécanisme d'accès alterné commun aux transporteurs actifs secondaires. Le mécanisme alterné se définit comme la succession de conformations d'un transporteur visant à transloquer un substrat, d'un côté à l'autre de la membrane, sans communication directe entre compartiments cellulaires.

La pseudo-symétrie est discutée dans plusieurs travaux comme une solution stratégique pour assurer la synchronisation de la rotation des domaines et l'absence de communication entre les compartiments lors du transport (Forrest et Radestock JMolBiol 2011; Duran et coll. ComputStructBiotechnol 2013). Le partage d'une architecture pseudo-symétrique commune entre transporteurs signe un mode de transport commun.

Il n'est cependant pas synonyme de substrat commun. La « Major Facilitator Superfamily », superfamille de transporteurs d'architecture commune, en est l'exemple. Les membres peuvent transporter de petites molécules anioniques, des nucléotides, des acides aminés et même des peptides entiers. Leur type de transport actif diffère selon le transporteur pour être en symport, antiport ou bien en uniport et les ions co-transportés peuvent être multiples ou absent. Cette diversité de transport ne s'explique pas par une différence de structure générale des protéines mais plutôt par des différences physico-chimiques ponctuelles entre transporteurs.

Les sites de liaison transporteur-substrat se situent au niveau des chaînes latérales de résidus le plus souvent enchâssés dans la membrane et exposés vers la cavité aqueuse des transporteurs. Leur nature physico-chimique est étroitement liée à celle des substrats et permet d'optimiser leurs attractions et leurs stabilisations lors du cycle de transport.

L'adaptation des résidus de la cavité aqueuse au substrat entraîne aussi nécessairement une différenciation entre domaines répétés d'un même transporteur. Les substrats sont généralement asymétriques, les ions co-transportés peuvent être unique à chaque cycle de transport et la direction du transport souvent orientée. Ces caractéristiques imposent aux transporteurs de développer des asymétries dans leurs structures symétriques pour assurer la spécificité à leurs substrats, à leurs ions co-transportés ou au sens du transport.

Une étude menée par le groupe d'Edmund Kunji de l'Université de Cambridge a d'ailleurs exploitée ces propriétés d'asymétrie pour dégager les sites de liaisons intra et intermoléculaires des transporteurs mitochondriaux.

### 1.3 - Etude antérieure sur les asymétries des transporteurs mitochondriaux

La famille des "Mitochondrial Carrier" (MC) comprend 48 transporteurs mitochondriaux répertoriés qui assurent entre autre la translocation de nucléotides, d'acides aminés ou d'acides carboxyliques. Ces transporteurs possèdent une structure pseudo-symétrique caractérisée, constituée de trois

domaines parallèles répétés. La plupart de ces transporteurs est caractérisée fonctionnellement.

Les chercheurs ont donc comparé les résidus des domaines répétés de ces transporteurs situés à la même position (résidus miroirs) pour dégager les positions asymétriques des différents groupes d'orthologues, ou ensembles. Le caractère asymétrique entre deux résidus est attribué par une matrice dont nous discuterons ultérieurement.

Les sites de liaison transporteur-substrat ou ion-transporteur étaient déjà connus au moment de l'étude et ils ont pu vérifier que ceux-ci correspondent à des **résidus, conservés**, situés à une **position asymétrique partagée** par plusieurs transporteurs. Ces résidus d'intérêt répondent aussi à deux règles:

- Les résidus conservés peuvent interagir soit directement avec des groupements chimiques de substrats asymétriques, soit avec un ion ou un proton.
- Les résidus conservés neutres font exception à cette règle car leur neutralité est maintenue par la pression de sélection pour ne pas influencer sur la liaison avec le substrat.

Les chercheurs ont aussi utilisé cette méthode pour analyser les boucles cytosoliques et luminales et ont pu mettre en évidence d'autres positions asymétriques ou symétriques partagées qu'ils prédisent comme la clé du mécanisme d'accès alterné de transport via la formation de ponts salins entre résidus asymétriques de chaque répliqua. Cette théorie a pu être appuyée grâce à

la structure cristalline des transporteurs dans plusieurs conformations et une proposition de mécanisme d'action a pu être émise.

#### 1.4 - Transposition de ce type d'étude aux protéines à motif PQ

Les protéines à motif PQ sont propices à ce type d'étude. Tout comme les transporteurs mitochondriaux, elles possèdent des domaines pseudo-symétriques parallèles pouvant être comparés. Aussi, plusieurs ensembles d'orthologues ont une topologie commune liée à un mécanisme de translocation à travers une membrane biologique (cystinosine, PQLC2 et MPU1), autorisant des comparaisons entre ensembles.

La pertinence biologique de l'asymétrie dans ces protéines est aussi vérifiée par la présence d'un résidu asymétrique dans la cystinosine, l'aspartate responsable du co-transport de protons (Ruivo et coll. PNAS 2011).

#### 1.5 - Asymétrie du résidu D305 de la cystinosine

L'aspartate en position 305 de la cystinosine humaine est l'initiateur de cette étude. Ce résidu chargé négativement est présent dans un segment transmembranaire du domaine PQ2. Il ne fait pas partie du motif PQ mais est très conservé dans la cystinosine.

Mon laboratoire d'accueil a pu mettre en évidence sa liaison avec le proton co-transporté à chaque cycle de transport d'une cystine. Des expériences de

mutagenèse dirigée effectuées dans cette étude ont montré que la conservation de l'aspartate était totale puisque son remplacement par l'acide aminé ayant les plus proches propriétés, le glutamate, est suffisant pour entraîner la perte d'activité de la cystinosine.

D'autre part, lorsque l'on aligne les deux domaines PQ entre eux pour un ensemble d'orthologues eucaryotes de la cystinosine, on observe dans le premier duplicat, désormais renommé "PQ1", à 98% une asparagine en tant que résidu miroir de l'aspartate dans le deuxième duplicat (soit le PQ2). L'asparagine est un acide aminé polaire mais non chargé, ce qui révèle déjà une première asymétrie physico-chimique de pertinence biologique.

Nous avons de ce fait décidé d'entreprendre une analyse bioinformatique des asymétries de la famille à motif PQ sur l'ensemble des protéines ayant une fonction biologique connue: la cystinosine, PQLC2, MPU1 et leurs orthologues respectifs.

## 2 - Préparation de l'analyse

Le but de cette analyse est donc de comparer les positions asymétriques conservées des trois membres de la famille PQ pour dégager des résidus pouvant être impliqués dans la liaison au substrat ou aux ions co-transportés lors du transport.

Le processus qui y mène comportent différentes étapes qui consistent à (1) récupérer un pool conséquent de séquences orthologues fiables pour chaque ensemble (cystinosine, PQLC2, MPU1) (2) *aligner les duplicats pour chaque*

*orthologue* pour **évaluer l'asymétrie des résidus** (3) *aligner les orthologues d'un même ensemble* pour **évaluer la conservation d'un résidu** dans celui-ci (4) *aligner les ensembles entre eux* pour **comparer leurs positions asymétriques conservées** et enfin (5) **analyser les résultats obtenus**. Les étapes (3) et (4) en pratique se résument à aligner les ensembles entre eux. La suite de cette partie décrit la *phase de préparation* pour ensuite aborder la **comparaison des séquences et l'analyse des résultats**.

## 2.1 – Obtention et tri des séquences

La première étape consiste à obtenir un pool conséquent de séquences orthologues pour assurer la fiabilité de l'étude. Pour cela, nous avons effectué un blast de chaque ensemble à partir du représentant humain et sélectionné les 250 protéines les plus proches de leur séquence sans distinction de règne.

Les bases de données disponibles sont le résultat de séquençages, parfois de masse, où figurent des séquences incomplètes ou erronées. Ainsi, pour une même espèce existent parfois plusieurs exemplaires d'une protéine résultant de séquençages imparfaits contenant des résidus surnuméraires ou manquants dans la séquence. La comparaison avec les séquences orthologues permet de détecter ces artefacts et de les retirer de l'étude.

Par ailleurs il existe un nombre important de redondance, notamment au niveau des orthologues de levure qui, pour une même espèce, possèdent plusieurs souches séquencées identiques. Pour éviter un éventuel biais dû à la

multiplication des mêmes séquences nous en avons sélectionné une seule par espèce.

Nous avons éliminé par ailleurs les séquences tronquées, le plus souvent en début ou fin de séquence, afin de réaliser la comparaison sur la plus grande partie possible de la protéine.

Enfin, nous avons décidé de ne conserver que les protéines faisant partie du règne des métazoaires et des levures afin d'homogénéiser l'étude. Les proportions pour chaque ensemble entre les règnes étaient relativement similaires, nous les avons conservés tel quel.

L'opération de tri a abouti à 174, 162 et 179 protéines pour l'ensemble cystinosine, PQLC2 et MPU1 respectivement. Une fois les séquences triées, nous avons entamé les étapes d'alignements de séquences préalables à leurs comparaisons.

## 2.2 - Alignement des ensembles cystinosine, PQLC2 et MPU1.

Pour aligner les séquences entre elles, nous avons utilisé dans un premier temps le logiciel ClustalW qui est d'usage courant pour ce genre d'étude.

Aucun algorithme du logiciel n'a malheureusement pu aligner correctement les séquences des ensembles entre elles. Néanmoins, ceci était prévisible puisque, comme nous l'avons dit précédemment, les membres de la famille PQ ont une faible homologie entre eux.

Pour "forcer" l'alignement des séquences, nous nous sommes orientés vers une méthode moins automatisée.

Nous avons exploité la haute conservation de la séquence du motif PQ afin de repérer et aligner les trois ensembles. Nous avons considéré le doublet PQ comme référence pour aligner les séquences. Le principe a donc été de parcourir la séquence jusqu'à détection d'un "PQ" pour ensuite pouvoir aligner le premier domaine, puis de recommencer le même processus jusqu'à un deuxième "PQ" pour aligner le deuxième domaine (figure 47).

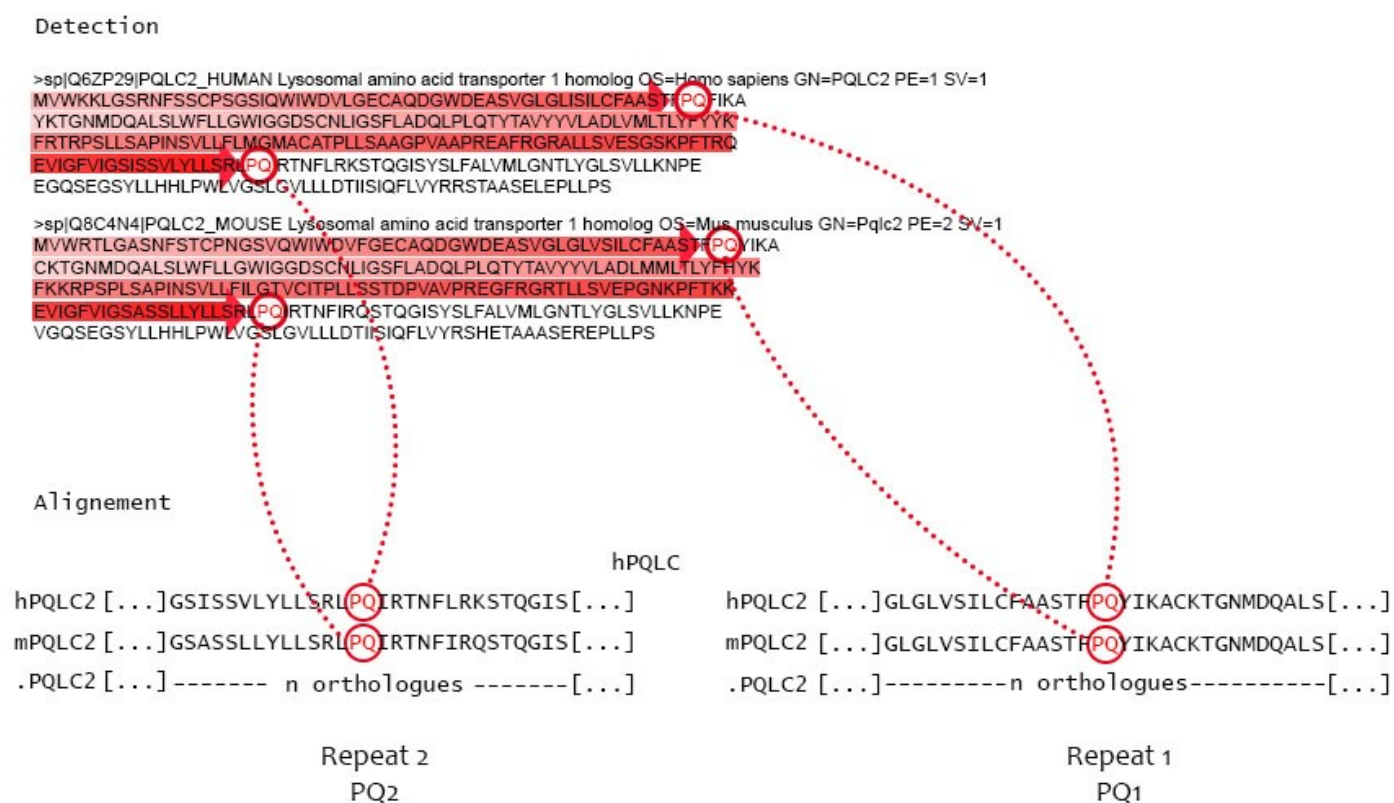


Figure 47. Méthode d'alignement des domaines répétés de la famille PQ. La séquence de chaque protéine est parcourue jusqu'à détection d'un doublet "PQ". Le premier doublet sert de référence pour aligner les résidus de part et d'autre. Le processus est renouvelé pour aligner le deuxième duplicat.



Cependant, plusieurs problèmes sont apparus lors de l'alignement par cette méthode. La détection du "PQ" du motif par le parcours de la séquence a engendré deux types de conflits.

D'une part, lorsqu'il existe plus de deux "PQ" dans une séquence protéique, il n'y a pas de différenciation entre un "vrai PQ" appartenant au motif et un "faux PQ" parasite. Nous avons donc utilisé une asparagine bien conservée en aval des "PQ" en tant que deuxième référence. Dès lors qu'un "PQ" détecté ne possédait pas cette asparagine à proximité les séquences ont été vérifiées individuellement pour recadrer ou valider le "PQ" référence.

D'autre part, une particularité du deuxième motif PQ de MPU1 est de ne pas avoir le doublet "PQ" conservé. On constate tout de même la conservation de la glutamine de ce doublet mais la proline est remplacée par un acide aminé apolaire majoritairement. La détection pseudo-automatique de l'emplacement référence a de ce fait été plus complexe. Nous avons pu pallier à ce problème en détectant les combinaisons de doublets apolaires-glutamine puis vérifié un à un les alignements.

La méthode employée pose aussi un autre souci. Les ensembles doivent *in fine* être comparés entre eux et il est nécessaire de s'assurer de leur bon alignement. La confiance dans l'alignement est totale pour les résidus adjacents au "PQ" mais elle baisse d'autant que l'on s'éloigne de la référence principale. Les boucles cytosoliques et luminales ne sont pas nécessairement de même taille entre ensembles et la fiabilité de l'alignement des autres TMs que ceux adjacents aux

références (TMs3-7 miroirs ) demeure incertaine dans ces conditions. Nous avons donc cherché d'autres références dans ces TMs pour pallier à ce problème.

Les TMs 2 et 6 possèdent une glycine suffisamment conservée entre les ensembles pour assurer leur bon alignement. Il s'avère que les boucles séparant le TM2 et le TM3 ou le TM6 et le TM7 sont de même taille pour les trois ensembles à l'exception de celle entre le TM6 et le TM7 des PQLC2 de mammifère qui possèdent un acide aminé supplémentaire. Cet acide aminé supplémentaire a été repéré et supprimé de l'analyse car il ne peut être comparé dans l'autre domaine.

Les TMs 1 et 5 quant à eux ne possèdent malheureusement pas de résidu pouvant faire office de référence secondaire. L'alignement de ces TMs est rendu approximatif et leur analyse ne figure donc pas dans les résultats qui vont suivre.

La zone de comparaison s'étend donc du début du TM2 à la fin du TM3 et sur la zone miroir entre le TM6 et le TM7 soit les deux tiers des zones dupliquées.

### 2.3 - Alignement entre duplicats de chaque protéines.

Le travail d'alignement intra-ensemble se base sur les mêmes principes que la comparaison inter-ensembles. En effet, les références sont les mêmes pour chaque domaine dès lors que le problème du "pseudo-PQ" de MPU1 est résolu et que le résidu supplémentaire de PQLC2 mammifère est artificiellement supprimé.

Le travail préalable d'alignement des séquences orthologues et des domaines répétés aboutit donc à la possibilité de comparer les séquences pour obtenir les données de conservation et d'asymétrie des duplicats de la famille PQ. Notre première approche a été d'utiliser sans a priori la même matrice que pour les travaux effectués par l'équipe d'Edmund Kunji sur les transporteurs mitochondriaux.

### 3 – Comparaison de séquence (asymétrie, conservation) avec la matrice de Cserzo et analyse des résultats.

#### 3.1 - Définitions préalables: asymétrie et conservation

Le degré d'asymétrie est défini par une matrice qui attribue un score entre -1 et 1. Le score de 1 représente deux résidus considérés comme similaires, soit une forte symétrie tandis qu'un score de -1 représente deux résidus considérés comme distincts. Cette distinction est dépendante des propriétés que prend en compte la matrice. Ainsi on peut évaluer les asymétries de taille, de polarité, de structure selon la matrice que l'on utilise.

Une fois cette matrice mise en place, la première étape dans cette phase est donc de comparer les duplicats entre eux pour chaque orthologue d'un ensemble protéique. On obtient pour chaque position "miroir" (comprenant deux résidus de position équivalente dans chaque duplicat) une asymétrie moyenne dans chacun des groupes orthologues (ou ensembles).

La deuxième étape consiste à comparer les résultats des ensembles et à repérer les positions asymétriques partagées par plusieurs d'entre eux. Celles-ci correspondent à des adaptations fonctionnelles à un niveau structural commun.

Enfin, les conservations des asymétries relevées dans la deuxième étape sont analysées. Chaque résidu du couple est examiné sur la distribution des acides aminés qui le représente dans le groupe d'orthologue. Une bonne conservation ne veut pas nécessairement dire que le résidu est représenté par un seul acide aminé mais plutôt que les acides aminés qui le représentent sont de même nature aux yeux de la matrice.

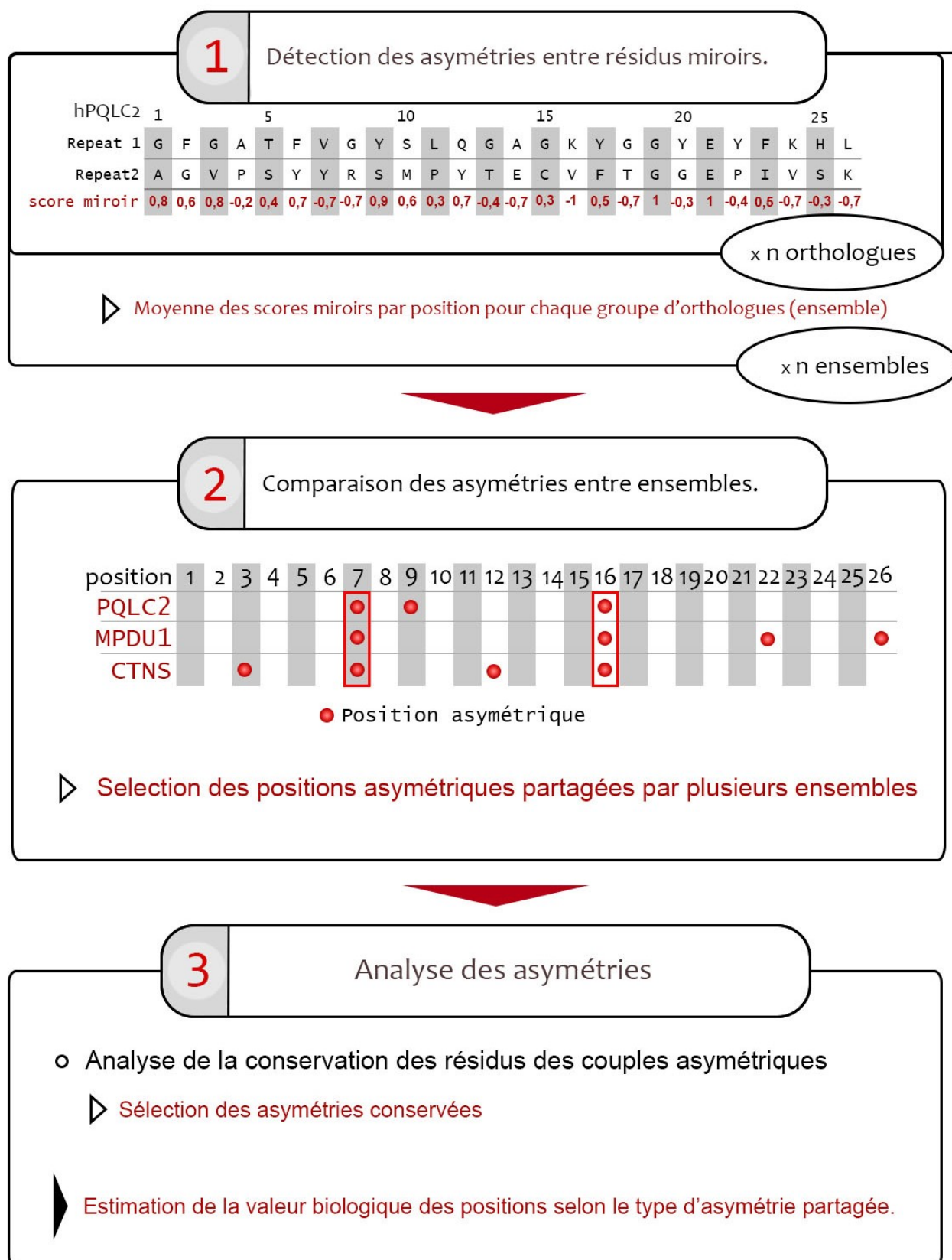


Figure 48. Etapes de l'analyse des asymétries entre domaines répétés de la famille PQ.

Les résidus d'intérêt ressortant de ces étapes sont donc les résidus conservés faisant partie d'une position miroir asymétrique. L'interprétation des résultats obtenus se fait ensuite selon les règles évoquées précédemment.

Pour une position asymétrique partagée par différents ensembles:

- Les résidus conservés peuvent interagir soit directement avec des groupements chimiques de substrats asymétriques, soit avec un ion ou un proton.
- Les résidus conservés neutre font exception à cette règle car leur neutralité est maintenue par la pression de sélection pour ne pas influencer sur la liaison avec le substrat.

### 3.2. Matrice de Cserzo

Nous avons donc comparé le PQ1 et le PQ2 pour chacun des orthologues des trois ensembles de la famille PQ. Le score attribué dépend de la matrice de Cserzo (Cserzo et coll. JMolBiol 1994). Celle-ci a été développée dans le but de déterminer les résidus isomorphes, soit ceux qui sont facilement interchangeables en conservant la stabilité et la structure d'une protéine. La matrice se base sur une étude statistique qui rapporte les différents types d'acides aminés retrouvés pour une même position dans une protéine. Un résidu Alanine (apolaire) par exemple sera, dans une protéine orthologue, remplacé plus régulièrement par une Valine (apolaire) que par un Aspartate (chargé). Plus deux résidus se trouvent souvent à une même position entre orthologues, moins le

changement dans la protéine sera conséquent. Au contraire, deux résidus très peu retrouvés à une même position seront considérés comme totalement différents du point de vue de la stabilité et de la structure protéique.

Pour deux résidus est associé un "indice d'interchangeabilité" qui correspond à l'influence qu'exerce le changement d'un résidu par l'autre, ou inversement, sur la stabilité et la structure protéique. L'indice varie de 1, lorsque la stabilité et la structure est conservée, à -1 lorsque la structure et la stabilité des protéines est fortement perturbée (figure 49). Cet indice sera utilisé pour évaluer le degré d'asymétrie entre les deux résidus structurellement symétriques dans chacun des domaines (résidus miroir). Nous parlerons dans ce cas de score miroir entre deux résidus. La matrice sera aussi utilisée pour estimer la conservation d'un même résidu entre orthologues.

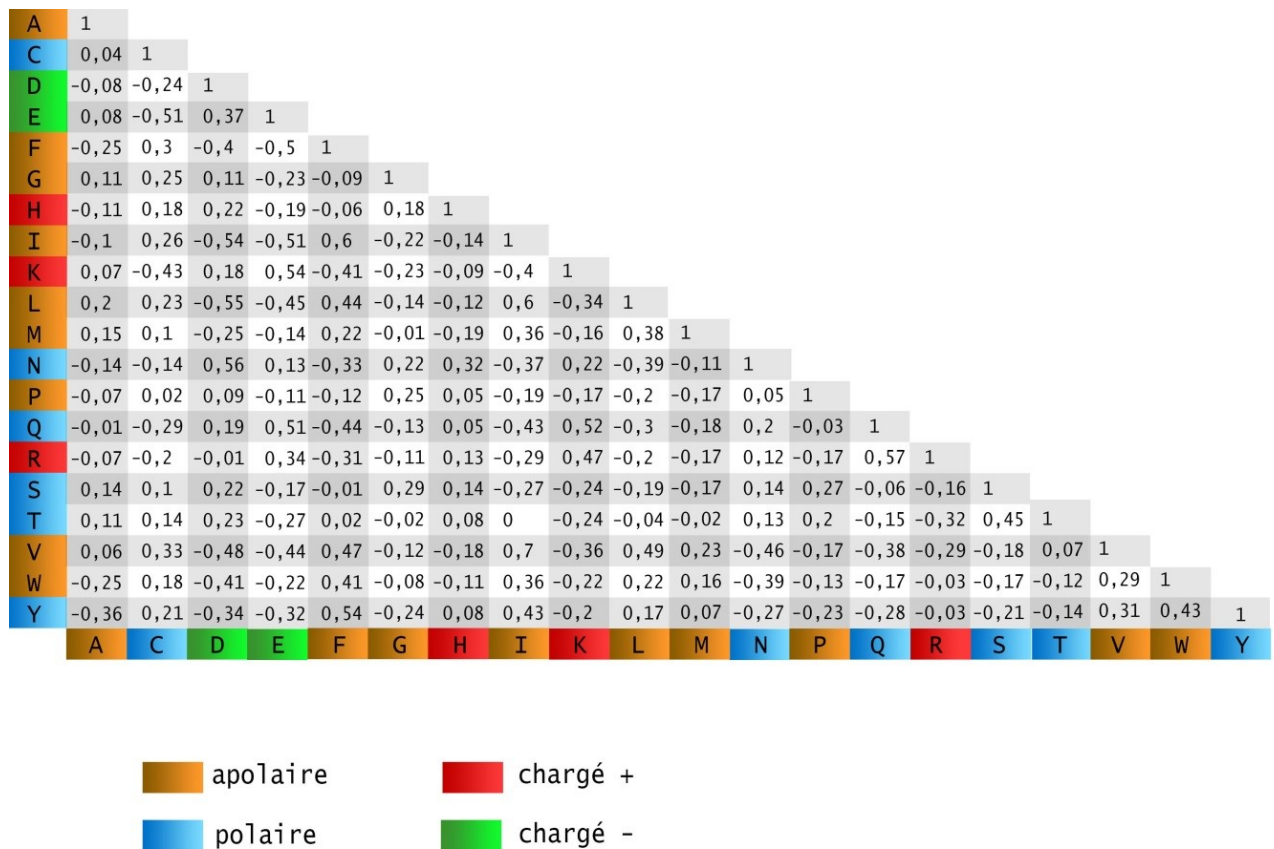


Figure 49. Matrice de Czerzo, utilisée pour l'analyse des asymétries fonctionnelles des transporteurs mitochondriaux. Chaque croisement entre ligne et colonne du tableau attribue un score d'interchangeabilité entre deux acides aminés, représentés en code à une lettre.

### 3.3 - Résultats

Pour chaque position miroir, nous avons moyenné les scores obtenus dans chacun des ensembles d'orthologues. La figure suivante résume ces résultats en faisant figurer les ensembles alignés entre eux (figure 50).



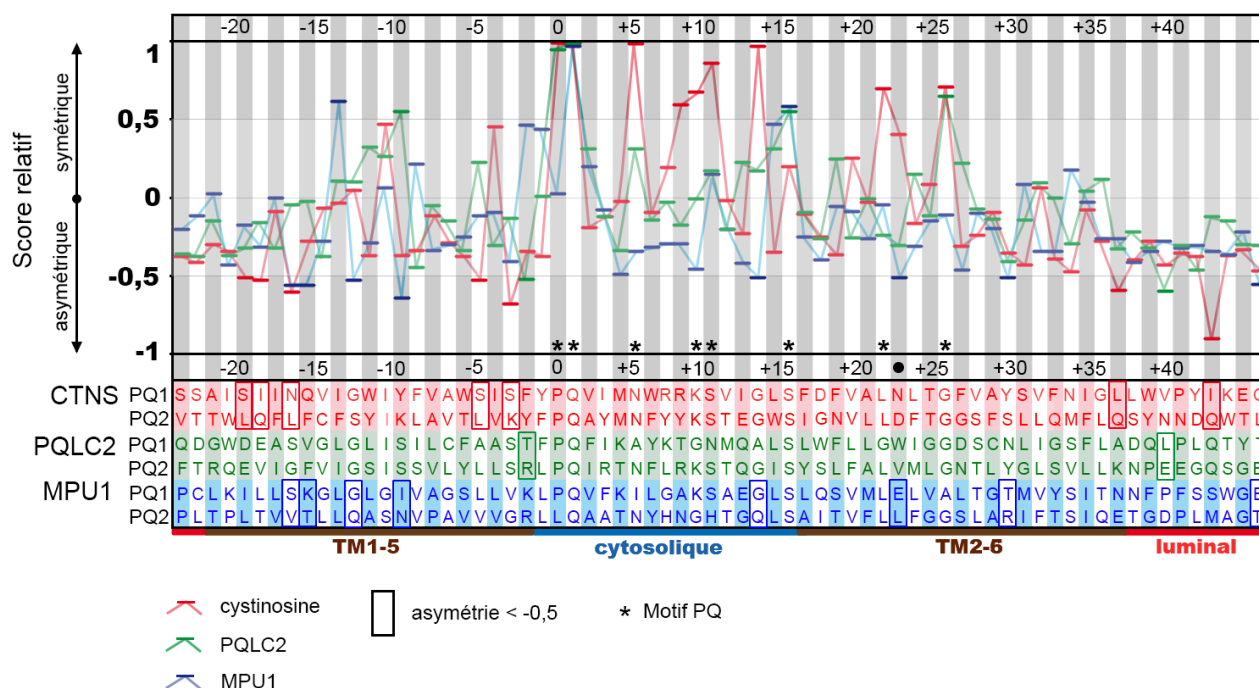


Figure 50. Moyenne des scores miroirs des couples de résidus pour chaque ensemble protéique selon la matrice de Cserzo. Les codes couleurs entre tracés et séquences sont respectés. Les séquences représentées sont celles de l'orthologue humain à titre illustratif et les positions sont relatives à la proline du motif PQ (position 0). Les étoiles et le rond plein noir indiquent le motif PQ tel qu'il est défini dans la littérature et la position du D305, respectivement. Les résidus miroirs asymétriques dont la moyenne est inférieure à 0,5 (seuil d'intérêt) sont encadrés au niveau de la séquence protéique. La conservation des résidus n'est pas prise en compte dans le graphique.

### 3.4 – Analyse des asymétries

#### 3.4.1 - Analyse générale des asymétries détectées.

La première constatation que l'on peut faire est que cette première approche ne détecte pas d'asymétrie pour le D305 (figure 50, position marqué d'un point noir) de la cystinosine que nous considérons comme témoin positif de l'étude. Bien au contraire, le score moyen des orthologues de la cystinosine à cette position est de +0.4, synonyme de symétrie dans la protéine.

L'explication d'un tel résultat provient du fait que la matrice utilisée fait une moindre différence entre les résidus chargés et polaires, en l'occurrence l'aspartate (D) et son asparagine miroir (N), qui possèdent pourtant des propriétés biochimiques bien distinctes. La matrice se focalise particulièrement sur l'influence des modifications de la structure primaire sur la structure tertiaire et fait une moindre considération de la capacité à lier et transporter des substrats qui peuvent être chargés. L'aspartate et l'asparagine sont deux résidus considérés comme interchangeables de ce point de vue.

Les chercheurs ayant développé la matrice ont d'ailleurs relevé ce point en s'étonnant que les charges des résidus ne soient pas prises en compte. Ils expliquent ce résultat par le fait que les contre-ions de la cellule permettent de neutraliser cette charge et qu'elle n'influe donc pas sur la stabilité de la protéine.

L'analyse approfondie des résultats conserve tout de même un intérêt car la matrice établit d'autres types d'asymétries qui peuvent s'avérer intéressantes. Nous avons donc approfondi l'analyse de ces résultats.

Les scores obtenus par cette méthode sont regroupés pour la grande majorité dans l'intervalle  $[-0,5 ; +0,5]$  que nous considérerons arbitrairement comme un intervalle négligeable. Le seuil d'intérêt d'asymétrie a donc été fixé à  $-0,5$ .

Dans ces conditions les ensembles ne partagent pas de positions asymétriques. La baisse du seuil d'intérêt pourrait être une manière de relever des positions asymétriques communes mais les scores asymétriques seraient confondus dans la distribution générale des scores miroirs.

Un résidu asymétrique conservé propre à un ensemble peut tout de même témoigner d'une adaptation spécifique à sa fonction. Nous ferons donc un rapide tour d'horizon des conservations des asymétries relevées par cette méthode, pour chaque ensemble, dans la condition seuil -0,5.

### 3.4.2 - Analyse des conservations et interprétation des résultats.

#### 3.4.2 a) PQLC2

Seuls deux couples de résidus miroirs se distinguent de par leurs asymétries chez PQLC2, la paire thréonine/arginine et la paire leucine/glutamate situées respectivement en position relative -2 et [+39] par rapport à la référence 0 de la proline du "PQ". Nous simplifierons désormais l'écriture de la position relative par la forme T/R[-2]et L/E[+39].

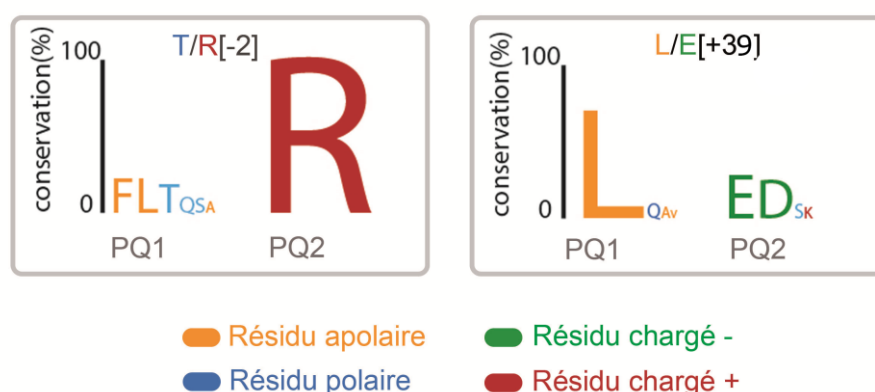


Figure 51. Représentation de la conservation des résidus, asymétriques selon la matrice de Cserzo, de **PQLC2**. Chaque acide aminé de chaque domaine (PQ1 colonne gauche, PQ2: colonne droite) est représenté en code une lettre de taille proportionnelle à sa proportion selon les espèces. Chaque couple miroir est désigné par sa position relative et par la paire de résidus miroirs correspondant à la séquence *humaine*. La nature biochimique du résidu est indiquée par la couleur de la lettre.

L'arginine de la première paire d'acide aminé asymétrique T/R[-2] de PQLC2 est parfaitement conservée en comparaison avec son résidu miroir dont la conservation est très faible (figure 51, gauche). L'arginine R[-2] pourrait donc être un résidu dont la conservation est importante pour l'activité de PQLC2. La paire miroir L/E possède au sein de chacun des domaines des résidus ayant une faible conservation (figure 51 droite). En PQ1 les deux résidus les plus représentés sont la leucine et la glutamine qui ont une très faible interchangeabilité selon la matrice (-0,3). En PQ2 la sérine (représentée à plus de 10%) est très faiblement interchangeable avec le glutamate (-0,17) majoritaire, soit une conservation moindre de ce résidu dans l'ensemble. Cette deuxième position ne semble donc pas présenter d'intérêt dans l'étude.

#### 3.4.2. b) Cystinosine

Six couples miroirs asymétriques sont détectés dans la cystinosine. Parmi eux, quatre font partie du premier TM du domaine répété, I/D[-19], S/L[-17], S/L[-5], S/K[-3]. Les deux autres sont à l'interface membrane lumen ou bien sur la boucle luminale de la zone analysée.

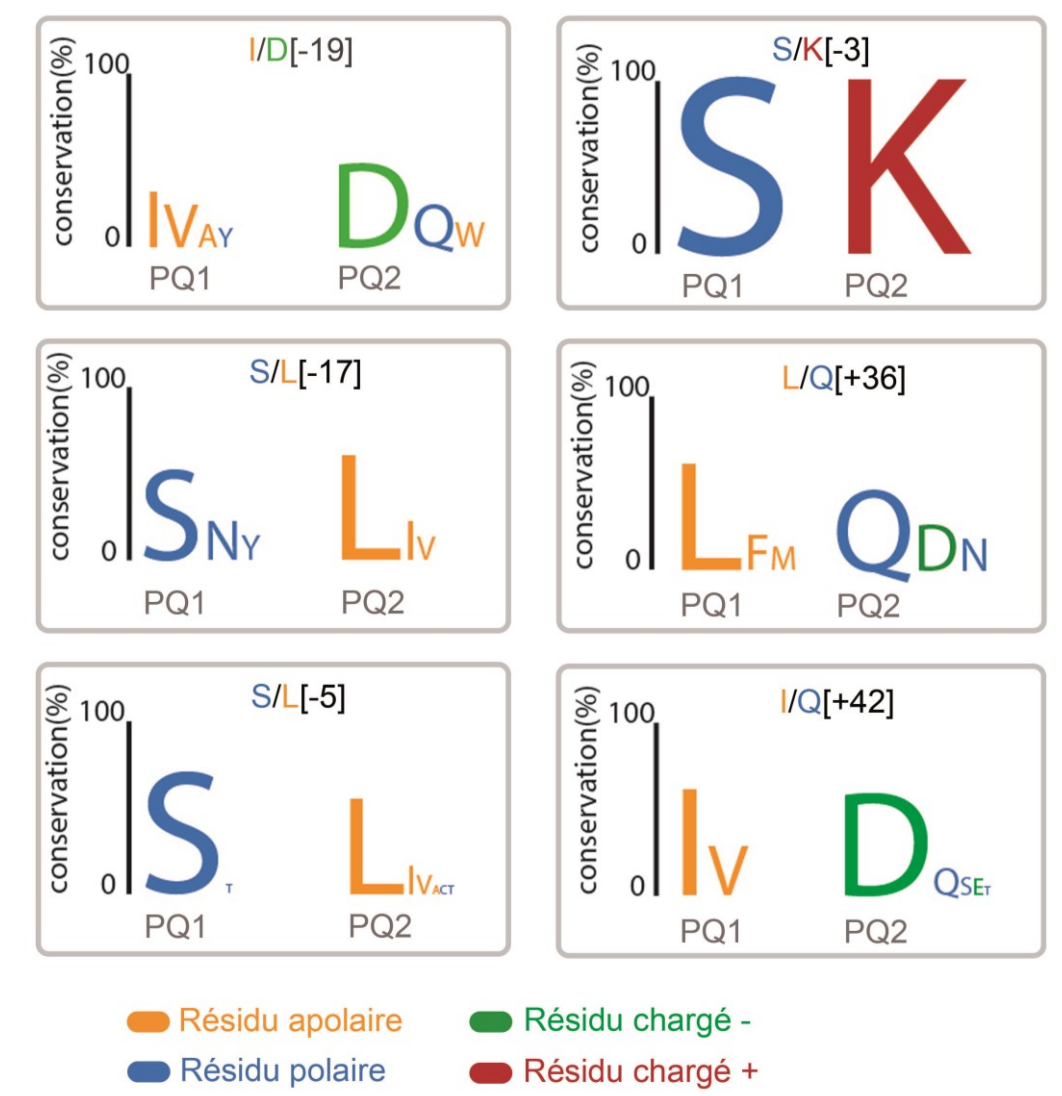


Figure 52. Représentation schématique de la conservation des résidus, asymétriques selon la matrice de Cserzo, de la cystinosine. Chaque acide aminé de chaque domaine (PQ1 colonne gauche, PQ2: colonne droite) est représenté en code une lettre de taille proportionnelle à sa conservation selon les espèces. Chaque couple miroir est désigné par sa position relative et par la paire de résidus miroirs correspondant à la séquence *humaine*. Dans le cas de la position +42, le résidu du deuxième motif PQ de la séquence humaine correspond à un acide aminé minoritaire parmi les espèces étudiées (métazoaires et levures). La nature biochimique du résidu est indiquée par la couleur.

Parmi celles-ci, une position se distingue par la conservation parfaite du couple d'acide aminé soit le S/K[-3] (figure 52, haut droite). Une telle conservation suggère qu'au moindre changement biochimique de ce couple, la protéine ne puisse assurer

son activité. Cette asymétrie membranaire très conservée est adjacente à celle relevée pour PQLC2 (T/R[-2]) et est de même nature, soit un résidu chargé positivement, ce qui pourrait révéler la nécessité commune de posséder une charge positive à ce niveau (figure 51 gauche). Les autres résultats quant à eux ont des conservations moins tranchées mais trois d'entre elles, S/L[-5] L/Q[+36] et I/Q[+42], ont une interchangeabilité relativement bonne pour chacun des résidus. La neutralité face à la polarité dans ces trois cas est très marquée ce qui pourrait laisser penser que cette distinction est nécessaire au bon fonctionnement de la cystinosine (figure 52, bas gauche, milieu droite et bas droite, respectivement).

### 3.4.2. c) MPU1

La comparaison inter-domaines pour MPU1 met en évidence sept paires de résidus miroirs possédant une asymétrie inférieure au seuil. Parmi celles-ci, quatre se distinguent par la conservation d'un acide aminé polaire ou chargé absolument conservé ou bien **interchangeable** soit S/L [-17], K/T[-16], **E**/L[+22] et **E**/G[+45] (figure 53). Parmi elles, la paire miroir E/L[+22] (figure 53, haute droite) se distingue par le fait d'être en position équivalente du D305 de la cystinosine. Ici, la matrice accorde une différence plus prononcée entre les résidus chargés négativement et la leucine ou bien la tyrosine qui leur font majoritairement face. Il est intéressant de noter qu'il existe en position [-2] une symétrie prononcée (+0,47) entre deux résidus chargés positivement, soit K/R[-2] avec une conservation absolue du R dans le PQ2. La lysine semble donc avoir une importance essentielle pour le fonctionnement de MPU1, notamment grâce à la charge qu'elle porte.

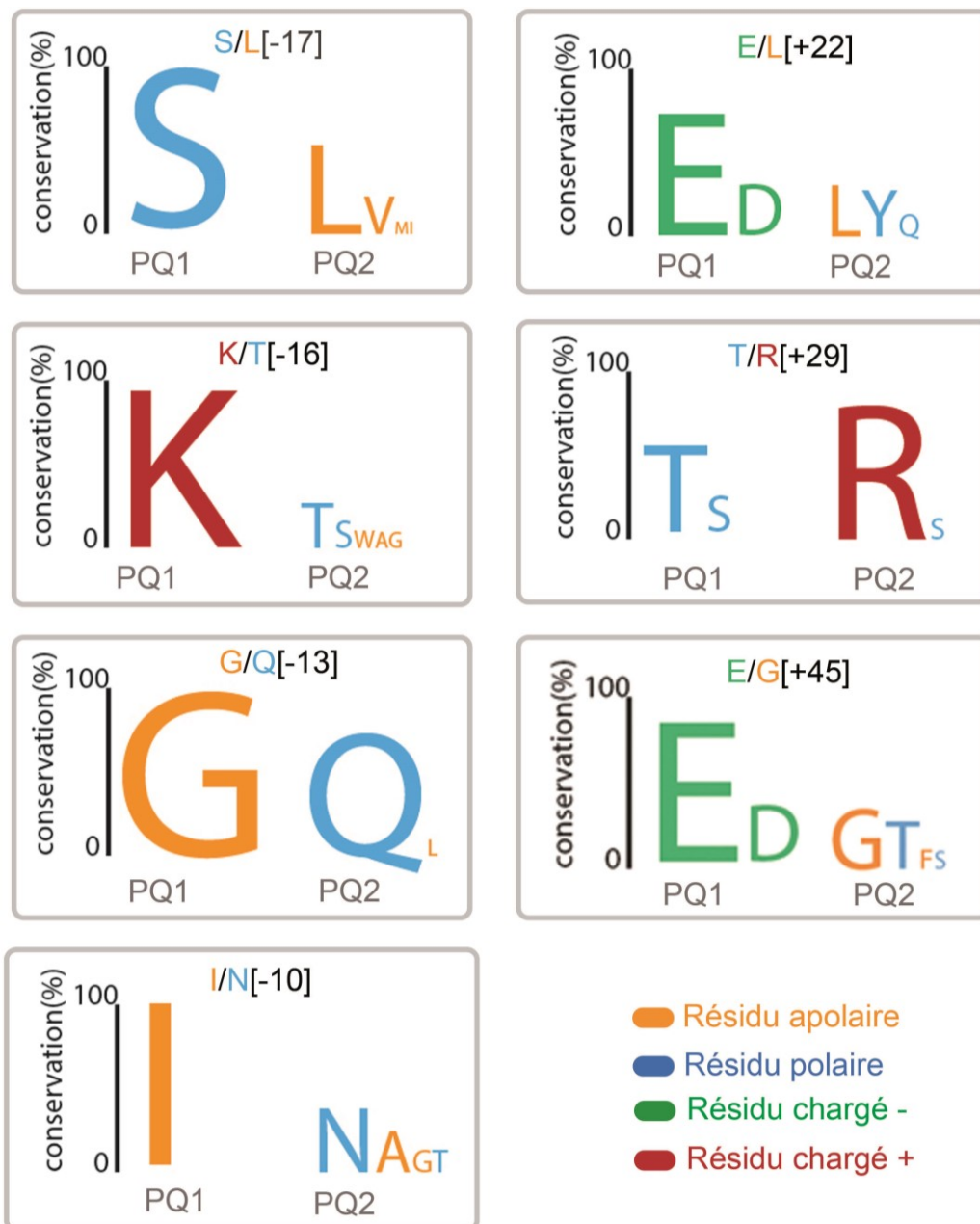


Figure 53. Représentation schématique de la conservation des résidus, asymétriques selon la matrice de Cserzo, de MPU1. Chaque acide aminé de chaque domaine (PQ1 colonne gauche, PQ2: colonne droite) est représenté en code une lettre de taille proportionnelle à sa conservation selon les espèces. Chaque couple miroir est désigné par sa position relative et par la paire de résidus miroirs correspondant à la séquence *humaine*. La nature biochimique du résidu est indiquée par la couleur.

### 3.5 - Matrice de Cserzo : Bilan

Les trois ensembles ne partagent donc pas de positions asymétriques ce qui limite l'interprétation des résultats. Les asymétries sont propres à chaque ensemble ce qui suggérerait des sites de liaison non communs pour ces trois protéines. Néanmoins, un résultat demeure très proche d'une asymétrie commune entre ces trois protéines. Il existe en effet un résidu asymétrique chargé positivement parfaitement conservé en position [-2] pour MPU1 et PQLC2 ou [-3] pour la cystinosine.

La position [-2] ou [-3] est membranaire, proche de l'interface entre membrane et cytoplasme (la position [0] étant à l'interface). La charge positive portée par les résidus de la famille PQ, peut avoir un rôle fonctionnel commun dans ces protéines. Cette position proche de l'interface pourrait être stratégique pour le mécanisme général du transporteur comme la création de ponts salins par exemple. C'est d'ailleurs à une position similaire que les résidus suggérés comme responsables du mécanisme d'accès alterné chez les transporteurs mitochondriaux ont été retrouvés (Robinson et coll. PNAS 2008).

La matrice utilisée dans cette première méthode n'a cependant pas permis d'identifier le résidu D305 de la cystinosine pourtant asymétrique d'un point de vue biochimique et très conservé. Nous avons donc décidé d'appliquer une nouvelle matrice, orientée vers les différences biochimiques entre résidus, afin d'adapter la méthode à nos recherches.



## 4 – Comparaison de séquence (asymétrie, conservation) avec une matrice "biochimique" et analyse des résultats.

### 4.1 - Elaboration de la matrice.

La cystinosine et PQLC2 stabilisent des charges positives portées par un proton ou par le substrat lors du transport. Les résidus chargés négativement ou aromatiques dans ces transporteurs jouent très certainement un rôle essentiel dans la liaison intermoléculaire. Le cycle aromatique porté par la tyrosine(Y), le tryptophane (W) ou la phenylalanine (F) a la faculté de stabiliser des éléments cationiques grâce à des liaisons dites "cation- $\pi$ ". De ce fait, les charges positives portées par les substrats de ces transporteurs pourraient être prises en charge par ces résidus pendant le transport. Dans la matrice précédente, ni les charges, ni les cycles aromatiques portés par les résidus ne sont distingués.

Nous avons donc défini une nouvelle matrice prenant en compte un seul paramètre, la classe des résidus, pour mieux appréhender les interactions avec les groupements chimiques des substrats. Nous avons groupé les acides aminés en fonction de leur classe chimique: polaires, apolaires, aromatiques, chargés positivement, chargés négativement. Nous avons attribué un score de -1 aux résidus miroir de classes différentes et un score de +1 à ceux de même classe (figure 54). Cela se résume donc à utiliser une matrice de "tout ou rien" en utilisant la même méthode que précédemment.

Après avoir obtenu la totalité des scores entre résidus miroir, nous avons calculé, pour chaque position miroir, la moyenne du score dans chacun des ensembles d'orthologues (figure 55).

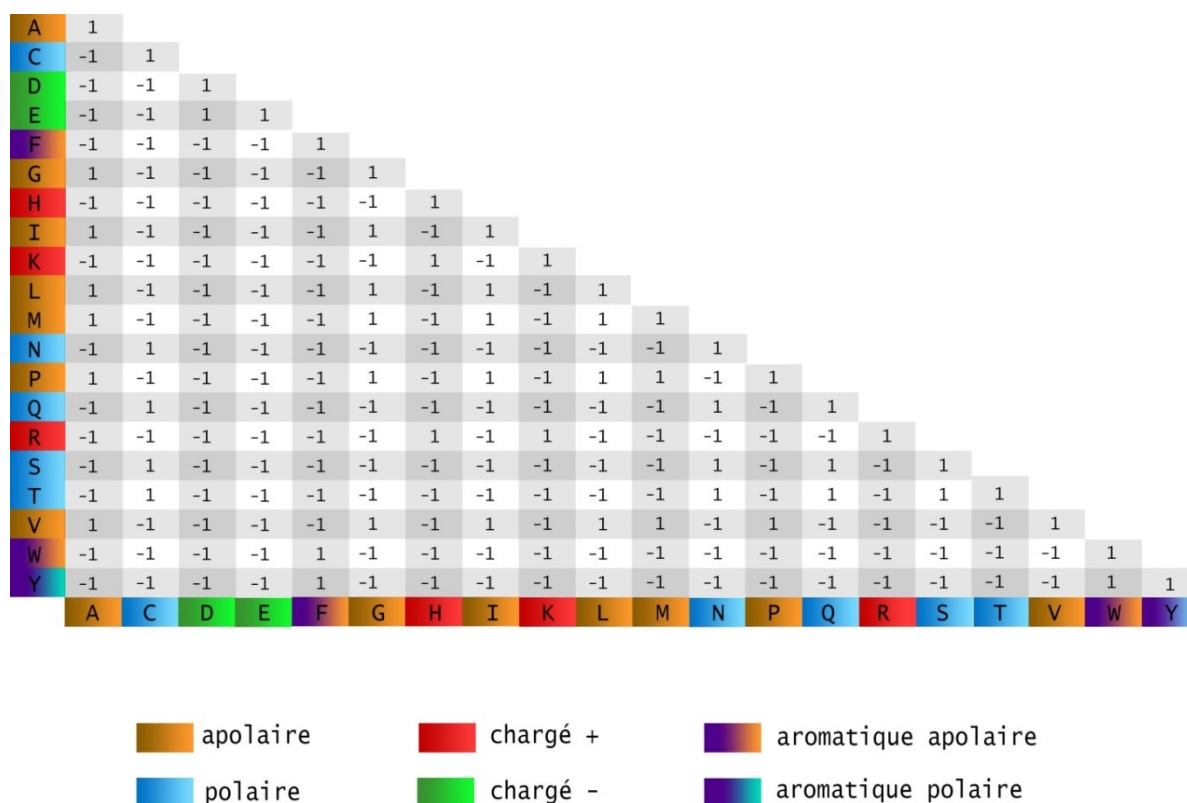


Figure 54. Matrice visant à la distinction des caractéristiques biochimiques des acides aminés.

## 4.2 - Attribution d'un facteur correctif aux résultats d'asymétrie

Une telle matrice engendre cependant des scores miroirs moyens proches de -1 car on retrouve une majorité de paires asymétriques dans cette matrice. Ainsi une série d'acides aminés prise aléatoirement face à une autre série aléatoire peut donner des résultats asymétriques. Pour corriger ce problème, nous avons décidé d'intégrer la conservation des propriétés chimiques dans le score moyen obtenu à une position miroir.

Cette valeur corrective correspond au pourcentage maximal de conservation de classe obtenu pour les résidus de la paire miroir

Ainsi, le score d'asymétrie d'un couple miroir (par exemple -0,8) se verra corrigé par le pourcentage de conservation du résidu le plus conservé dans le couple. Si la classe d'un des deux résidus est très conservée, par exemple à 90%, alors le score de symétrie sera toujours élevé (soit  $-0,8 * 90\%$ ). Au contraire, si les deux résidus miroirs ont des équivalents entre orthologues n'étant pas de même classe, alors le score de symétrie sera radicalement baissé et le faux-positif aura une visibilité réduite.

#### 4.3 - Résultats

Ces conditions sont malgré tout plus lâches que la méthode précédente. Nous avons donc décidé d'utiliser un seuil de tolérance plus stringent de -0,7 pour sélectionner les résultats les plus tranchés. La figure suivante résume les résultats obtenus en faisant figurer les ensembles alignés entre eux (figure 55).

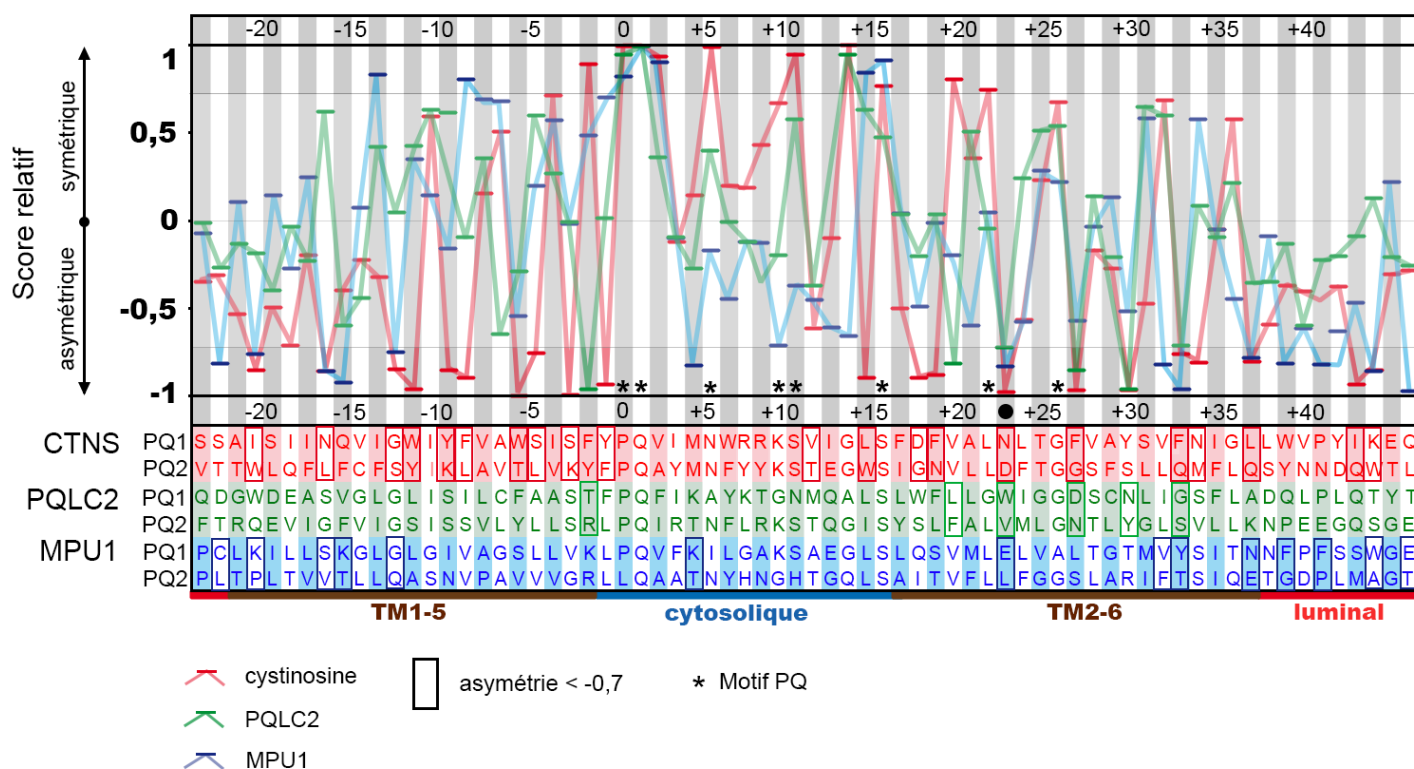


Figure 55. Moyenne des scores d'asymétries des résidus miroirs pour chaque ensemble protéique selon la matrice "biochimique". Les codes couleurs entre tracés et séquences sont respectés. Les séquences représentées sont celles de l'orthologue humain à titre illustratif et les positions sont relatives à la proline du motif PQ (position 0). Les étoiles et le rond plein noir indiquent le motif PQ tel qu'il est défini dans la littérature et la position du D305. Les positions miroirs dont la moyenne est inférieure au seuil d'intérêt (-0,7) sont encadrées.

Le premier constat après utilisation de cette nouvelle matrice est que les résultats asymétriques sont plus nombreux sans pour autant être trop abondants (et donc ininterprétables) et incluent le résidu D305 de la cystinosine (rond noir figure55).

## 4.4 - Analyse des asymétries.

Afin de visualiser les résultats plus facilement nous avons effectué un bilan schématique de l'analyse bioinformatique (figure 56). Chaque segment transmembranaire 'miroir' est schématisé avec une rotation arbitraire qui ne représente pas la réalité (7 résidus par tour d'hélice au lieu de 3,5). Les segments transmembranaires sont regroupés en miroir et les résidus équivalents pour chaque ensemble sont alignés horizontalement.

### 4.4.1 - TMs miroirs 1 et 5.

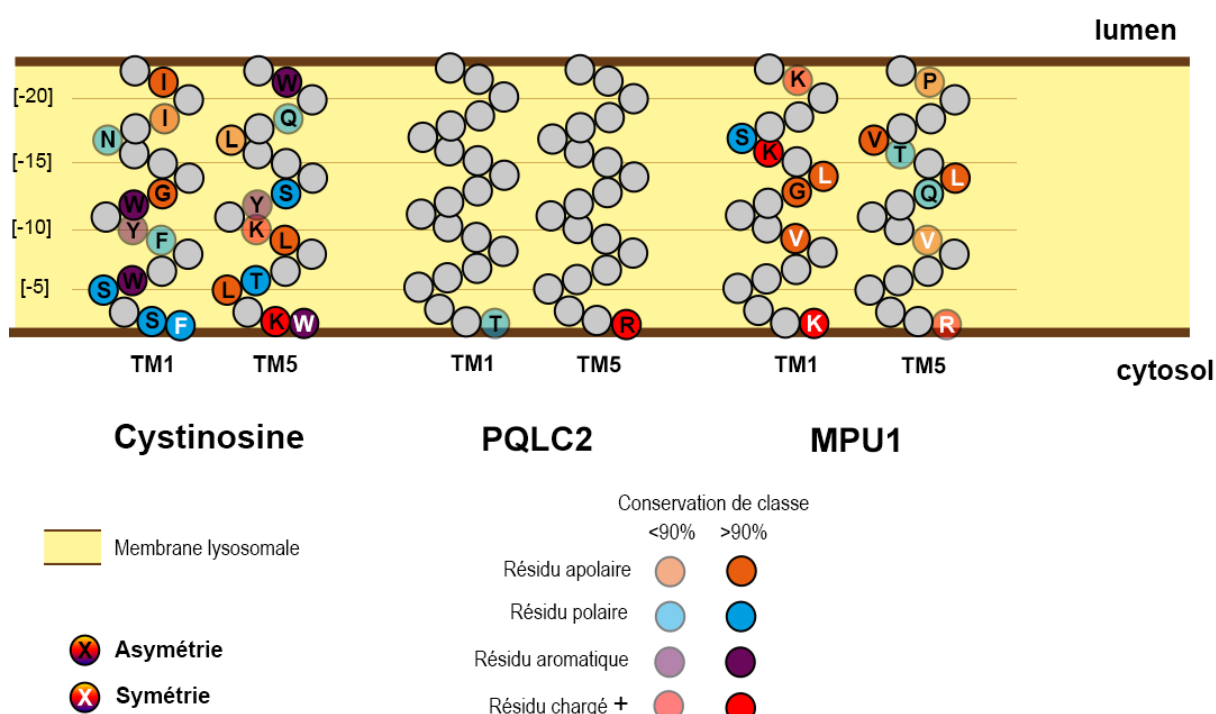


Figure 56: Schéma des asymétries biochimiques des TMs1-5 miroirs des membres de la famille PQ. Sont représentés par des lettres les résidus dont les scores finaux dépassent le seuil d'asymétrie pour chaque ensemble. Le tour d'hélice a été choisi arbitrairement.

De manière générale, la cystinosine possède ici une asymétrie très prononcée en comparaison de PQLC2 et, dans une moindre mesure, de MPU1.

Les asymétries de la cystinosine contiennent un nombre important de résidus polaires, chargés ou aromatiques conservés. On constate que le K[-3], résultat marquant de la précédente analyse ressort aussi dans cette approche.

Pour PQLC2, on trouve une seule asymétrie, du côté cytosolique, avec une charge positive très conservée qui est le K[-2] lui aussi relevé dans l'approche précédente.

MPU1 quant à lui possède deux asymétries contenant un résidu polaire ou chargé conservé. Les autres sont des asymétries apolaires conservées ce qui ne rentre pas en compte dans notre étude. Il est intéressant de noter tout de même que la position K/R[-2] est relevée comme symétrique avec toujours cette conservation absolue du R dans le PQ2.

Les profils des trois protéines possèdent de grosses disparités de profils ce qui suggère un niveau d'importance hétérogène de ces TMs dans leurs fonctions.

#### 4.4.2 - TMs miroirs 2 et 6

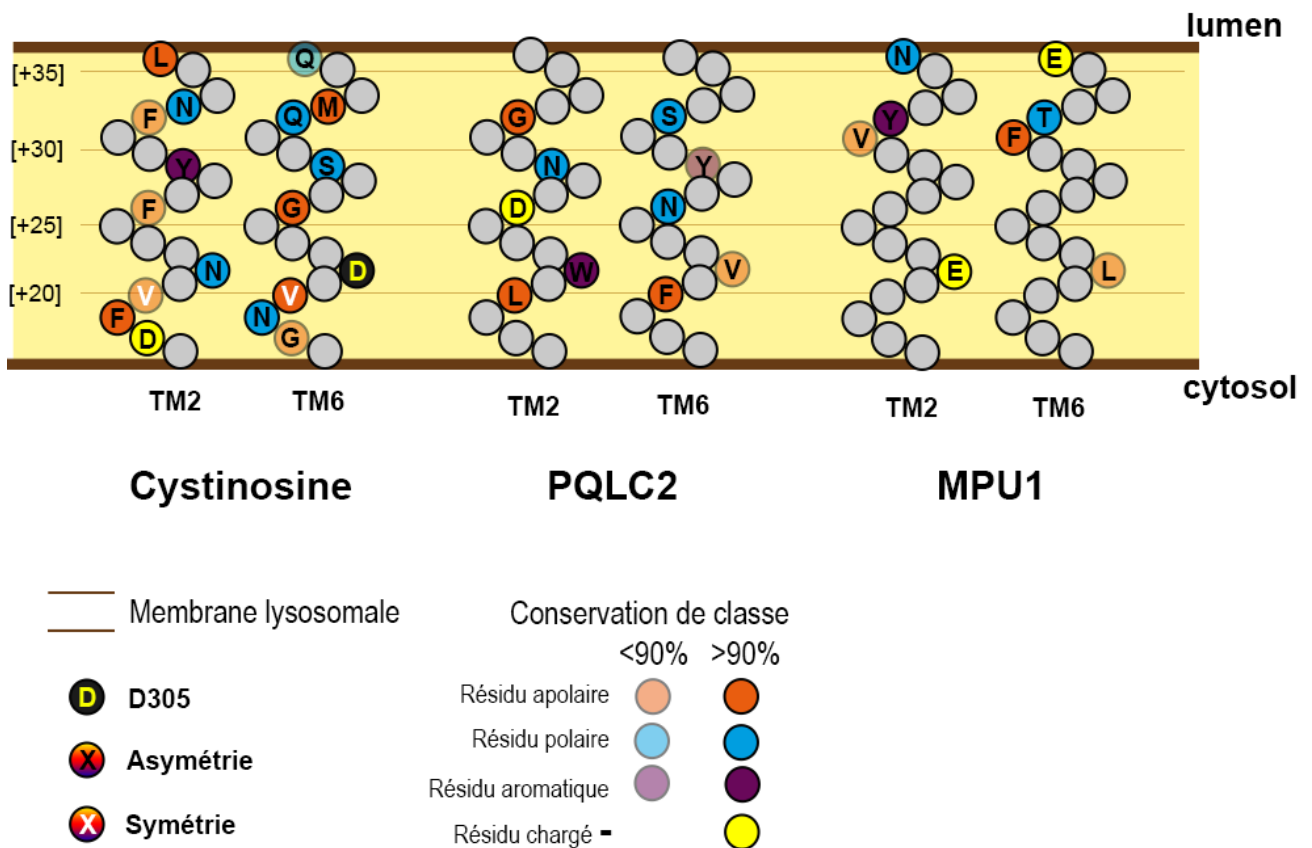


Figure 57. Schéma des asymétries biochimiques des TMs2-6 miroirs des membres de la famille PQ. Sont représentés par des lettres les résidus dont les scores finaux dépassent le seuil de symétrie ou d'asymétrie pour chaque ensemble. Deux positions sont asymétriques pour les trois ensembles, [+22] et [+32], deux autres le sont pour les deux transporteurs lysosomaux, [+26] et [+29]. Le tour d'hélice a été choisi arbitrairement.

Ici on constate qu'il existe des asymétries où un résidu polaire, chargé négativement ou aromatique est conservé (figure 57). Ceci marque généralement un microenvironnement hydrophile, assimilable à la cavité des transporteurs du fait de leur enchâssement dans la membrane hydrophobe. Aussi, certaines positions miroirs asymétriques sont partagées par plusieurs ensembles. Deux positions asymétriques sont partagées par PQLC2 et la cystinosine, deux autres

par les trois ensembles. Ces quatre asymétries sont espacées de trois à quatre résidus ce qui correspond à une moyenne d'un tour d'hélice (3,5 AA / tour d'hélice).

#### **4.4.3 Conservation et interprétation des asymétries partagées par plusieurs ensembles**

##### **4.4.3. a) Asymétries de même nature biochimique.**

Les asymétries en positions [+29] et [+32] sont chacune de même type pour PQLC2 et la cystinosine. D'une part, un couple tyrosine/résidu polaire bien conservé en [+29] et de l'autre, un couple polaire/apolaire majoritaire en [+32]. (figure 58 haut et bas, respectivement). Comme nous l'avons défini auparavant, une asymétrie de même type pour deux ensembles peut être assimilée à une spécification similaire de ces protéines. Ainsi ces positions pourraient être des résidus de la cavité des transporteurs dédiés à la reconnaissance de fonctions chimiques communes à leurs substrats. En l'occurrence, la fonction amine ou bien acide des acides aminés transportés.



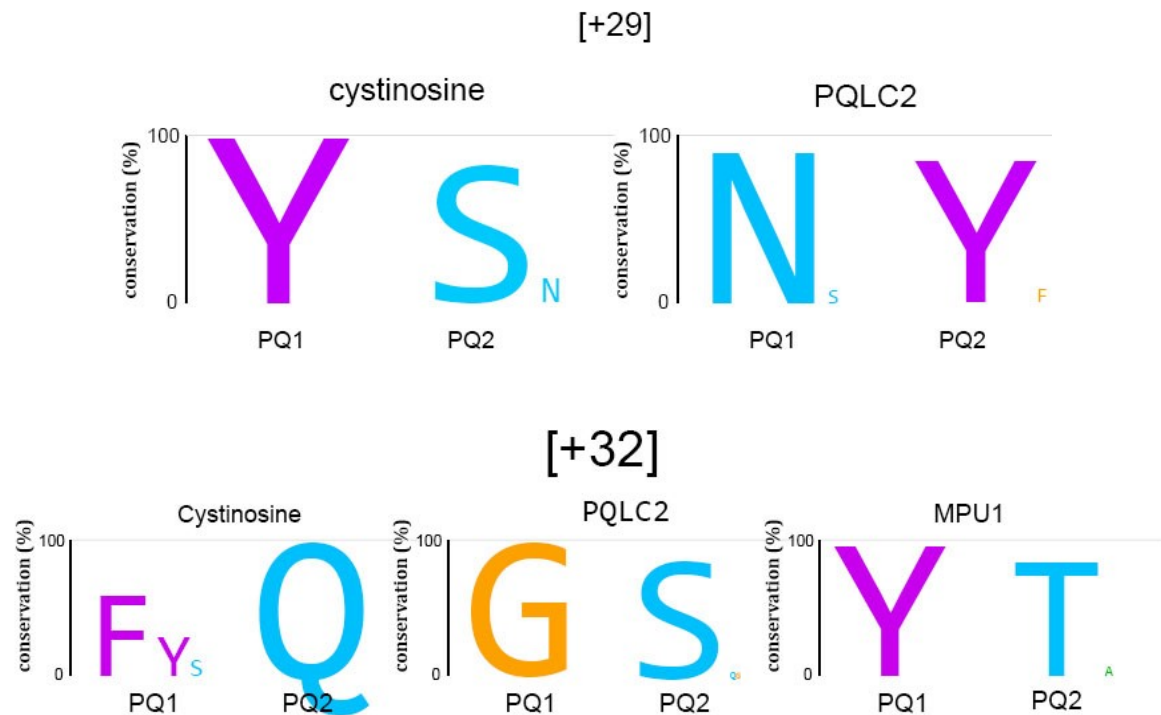


Figure 58. Conservation des résidus asymétriques, selon la matrice biochimique, des ensembles cystinosine et PQLC2 pour la position [+29] et des trois ensembles pour la position [+32]. La position relative est associée au couple miroir de la séquence humaine. La nature biochimique des résidus est indiquée par la couleur de la lettre (violet: résidus aromatique, en bleu ciel: résidu polaire, en orange: résidu apolaire)

#### 4.4.3. b) Asymétries de nature biochimique distincte.

La position [+22] (figure 59, haut) ainsi que la [+26] (figure 59, bas) correspondent à une asymétrie de nature physico-chimique distincte entre PQLC2 et la cystinosine.

En [+22] pour la cystinosine existe un couple polaire/chargé négativement et pour PQLC2 un couple aromatique/apolaire. Ce résultat est le plus fort de cette étude puisqu'il intègre le D305 de la cystinosine déjà connu pour régir le co-transport

ionique et pourrait expliquer à lui seul la différence de type de transport actif entre PQLC2 et la cystinosine.

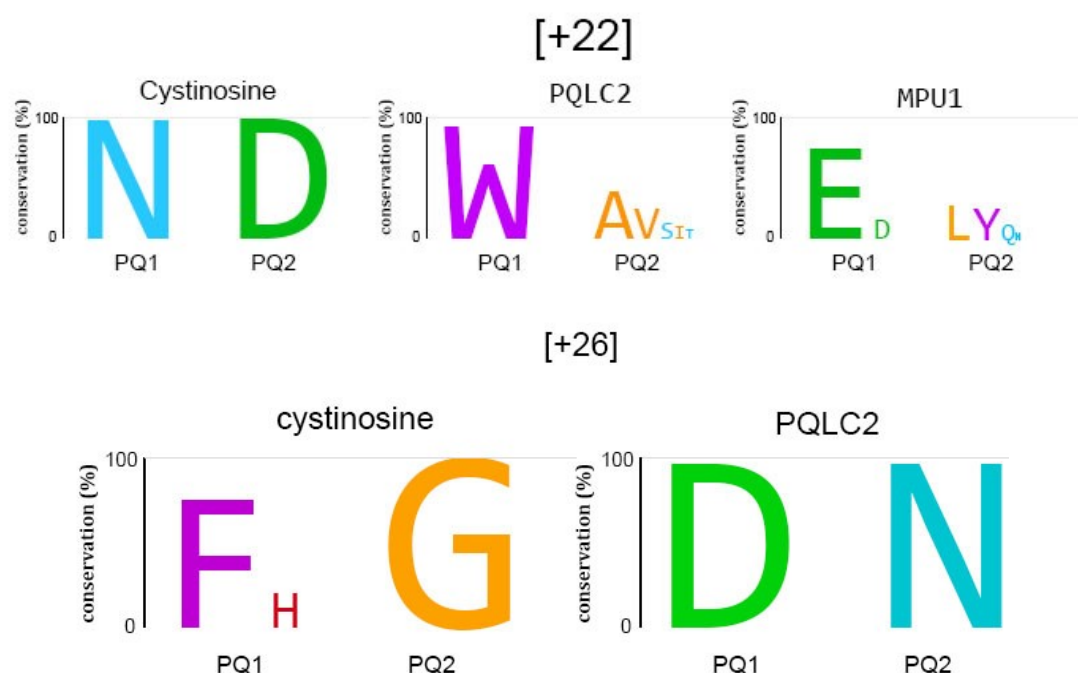


Figure 59. Conservation des résidus asymétriques, selon la matrice "biochimique", des ensembles cystinosine et PQLC2 pour la position [+26] et des trois ensembles pour la position [+22]. La position relative est associée au couple miroir de la séquence humaine. La nature biochimique des résidus est indiquée par la couleur de la lettre (violet: résidus aromatique, en bleu ciel: résidu polaire, en orange: résidu apolaire)

Selon les récentes recherches de notre laboratoire, l'activité de PQLC2 serait de type uniport à la différence de la cystinosine qui serait un symporteur. La stœchiométrie 1:1 de PQLC2 due à la charge portée par le substrat peut prendre sens car le cycle aromatique possède une propriété stabilisatrice des charges positives. La position [+22] du PQ1 de PQLC2 pourrait donc capter la charge positive portée par ses substrats tandis que l'aspartate en [+22] du PQ2 de la cystinosine co-transporterait un proton par mécanisme acido-basique.

Enfin la position relative [+26] est non moins intéressante car elle présente une forte différence entre PQLC2 et la cystinosine. D'une part on constate un couple chargé négativement/polaire très conservé pour PQLC2 tandis que le couple pour la cystinosine est aromatique/apolaire majoritaire (voire chargé positivement dans le cas de l'histidine). Cette différence suggère que, tout comme la position [+22], la position [+26] corresponde à une spécification distincte de chaque protéine. Il est à noter que les deux positions sont séparées d'un tour d'hélice ce qui leur confère une forte proximité spatiale. Le cycle aromatique et l'aspartate de PQLC2 sont donc très proches et pourraient jouer un rôle synergique dans l'attraction et la stabilisation du substrat. Au contraire, pour la cystinosine, la conservation totale de la glycine, acide aminé le plus petit, en [+26] pourrait être le signe d'une spécification, non pas dans la liaison au substrat, mais plutôt dans la nécessité de ne pas perturber la liaison du proton au D305.

Ces résultats nous permettent ainsi de proposer un modèle d'interaction transporteur-substrat pour la cystinosine et PQLC2 (figure 60):

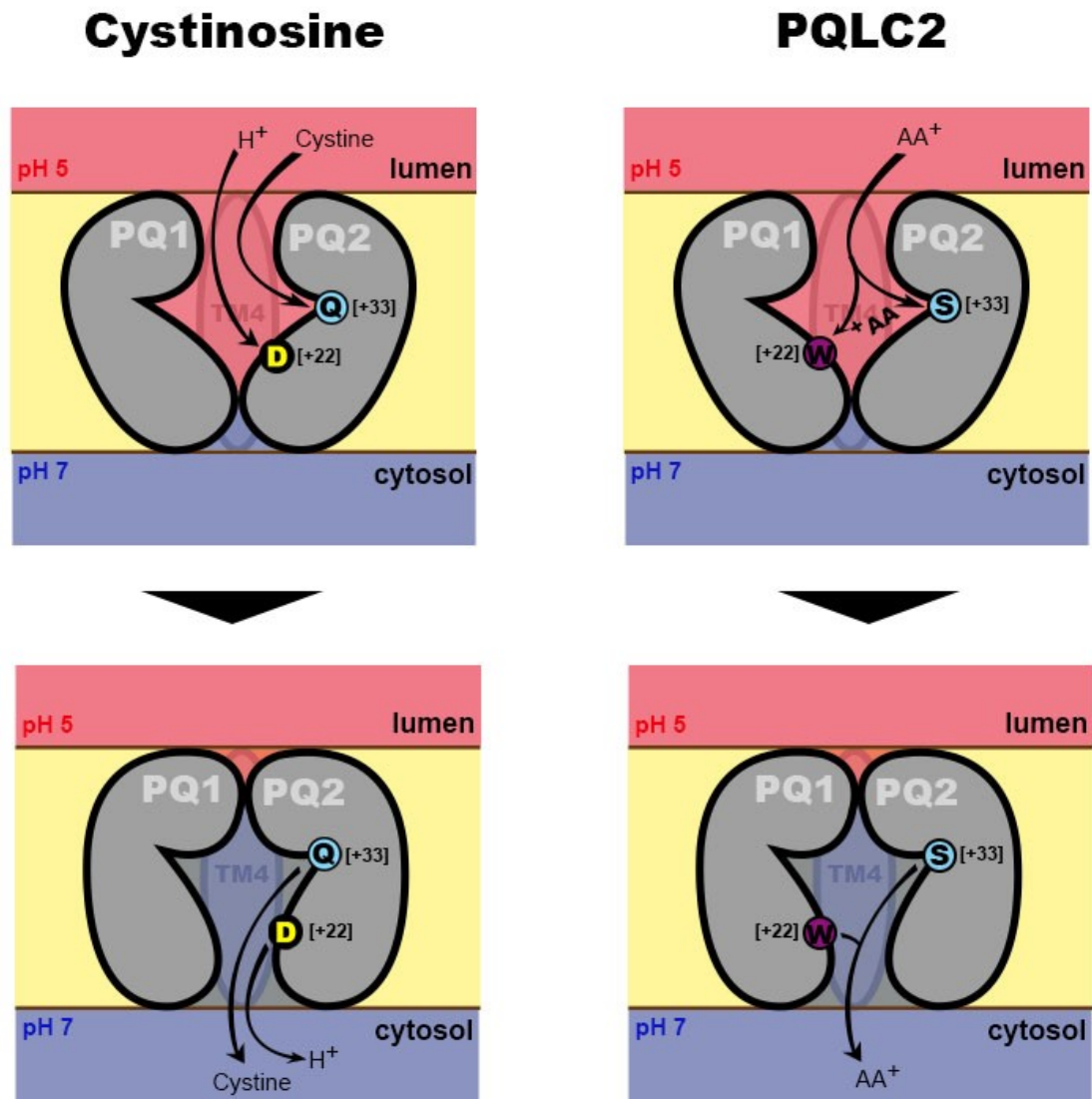


Figure 60. Modèle théorique du mécanisme de transport de la cystinosine et de PQLC2. (cf ci-après)

La glutamine (Q) et la serine (S) polaires et asymétriques conservées en [+33] permettraient donc une interaction avec une partie commune aux substrats de la cystinosine et de PQLC2, notamment au niveau de leur partie amino-acide qu'ils partagent. La deuxième asymétrie, de nature différente au niveau de la position [+22] est certainement la clé du mécanisme stabilisateur de la charge positive du proton co-transporté par la cystinosine ou bien par le substrat de PQLC2. D'un

côté, le D305 assure par mécanisme acido-basique le passage d'un proton à chaque cycle de transport tandis que le cycle aromatique du tryptophane de PQLC2 stabilise la charge portée par l'acide aminé basique transporté.

Même si ce modèle semble apporter une cohérence à la stœchiométrie 1:1 de PQLC2, la translocation d'un proton par PQLC2 n'est pas à exclure. Le transporteur pourrait tout aussi bien transloquer un proton vers le cytoplasme et une autre charge positive dans le lumen à chaque cycle de transport. Dans ce scénario, le D[+26] serait un candidat idéal. Sa place dans le PQ1 est quasiment équivalente au D305 dans le PQ2 puisqu'il est à un tour d'hélice de celui-ci, donc orienté de la même manière, et sa conservation est totale. Ce cas de figure entraînerait théoriquement une autre position asymétrique responsable de la translocation de l'autre ion co-transporté, ce qui n'est pas le cas. Néanmoins la zone d'analyse ne comprend pas la protéine complète et peut expliquer ce constat.

#### **4.4.4 – Perspectives de validation des théories par analyses électrophysiologiques**

Afin d'éclaircir ces points il est à envisager d'effectuer des mutations ponctuelles au niveau des acides aminés conservés de ces couples pour évaluer les conséquences sur le transport par analyse électrophysiologique.

Le choix de la nature de la mutation pourrait être orienté grâce aux données de cette étude et notamment en effectuant des mutations "naturelles", présentes dans d'autres espèces ce qui permettrait d'avoir des modifications partielles du

comportement des transporteurs face aux substrats, peut-être même distinctement.

L'obtention de la structure cristalline de ces protéines sera un support solide pour vérifier ces théories, notamment au niveau de la compatibilité de distance entre résidus d'intérêts et taille du substrat. La confrontation des futurs tests électrophysiologiques et de la structure sera donc la clé de la compréhension du mécanisme de transport tant sur les liaisons intra- qu'intermoléculaires.



## Discussion / Perspectives

### 1 - Emergence d'une nouvelle approche.

La connaissance de la composition de la membrane lysosomale s'est améliorée grâce à la spectrométrie de masse et l'affinement des conditions de purification, et permet désormais de disposer d'une liste quasi exhaustive des protéines de la membrane lysosomale. L'étude à laquelle mon laboratoire d'accueil a collaboré a pu prédire 734 protéines associées ou appartenant à la membrane lysosomale parmi lesquelles 42 font partie d'une famille de transporteurs secondaires (Chapel et coll. MolCellProteomics 2013). L'observation de la localisation d'une douzaine de protéines (parmi les 42) fusionnées à une protéine fluorescente, dans des cellules de mammifère, confirme à 75% les prédictions établies. Sur ces bases, on peut spéculer sur un nombre de transporteurs secondaires actifs lysosomaux supérieur à 30, tandis que moins d'une dizaine ont leurs activités caractérisées. Ce type d'étude établit donc une liste fournie de transporteurs lysosomaux potentiels.

Le modèle du "lysosome géant" utilisé tout au long de la première partie de cette thèse figure désormais comme un modèle privilégié dans la caractérisation de transporteurs lysosomaux. La délocalisation des protéines d'intérêt à la membrane plasmique d'ovocyte de Xénope présente l'avantage d'obtenir rapidement une interface d'échange accessible, étendue, présentant en masse la protéine d'intérêt et dont le transport endogène est atténué à bas pH dans la



majorité des cas. Ces caractéristiques augmentent ainsi le rendement des tests de transport en électrophysiologie sur cellules entières.

La connaissance d'une liste fiable de transporteurs lysosomaux et le test rapide du transport en électrophysiologie sur ovocyte permettent d'envisager une prochaine accélération de la caractérisation des transporteurs du lysosome par analyse des courants induits, aux passages de soupes métaboliques de composition définie, pour un grand nombre de transporteurs.

## 2 - La structure 3D de la famille PQ: point d'appui de plusieurs voies de recherches futures.

### 2.1 - Etude structurale

La caractérisation fonctionnelle de PQLC2 signe l'émergence d'une nouvelle famille de transporteurs secondaires. Elle se compose désormais de deux transporteurs secondaires caractérisés, la cystinosine et PQLC2 (Kalatzis, Cherqui, Antignac, Gasnier EMBO J 2001; Jézégou et coll. PNAS 2012). Les études sur MPU1 montrent qu'il joue un rôle dans la translocation des donneurs de sucres à travers la membrane du RE, sans pour autant donner une preuve directe de sa fonction (Anand et coll. MolBiolCell 2001, Ware& Lehrman J Biol Chem. 1996).

Trois des cinq membres de la famille PQ sont donc reliés par leur activité de transport, PQLC2 la cystinosine et MPU1. Les deux autres membres,

PQLC1 et PQLC3, représentent un terrain d'étude vierge puisqu'aucun travail n'a encore été mené dessus.

Cette petite famille de transporteur, associée à celle des transporteurs de sucres SWEETs, définit désormais la 9<sup>e</sup> architecture dans le répertoire topologique des transporteurs secondaires (Shi AnnuRevBiophys.2013.).

C'est aussi une nouveauté du point de vue de la pseudo symétrie. Jusqu'à lors, les pseudo-symétries connues des transporteurs secondaires étaient de deux types. Une première avec trois domaines répétés parallèles entre eux ou bien une deuxième avec deux domaines répétés antiparallèles. La famille PQ possède une troisième forme de pseudo-symétrie qui comprend deux domaines parallèles.

Celle-ci a pu être vérifiée dans mon laboratoire d'accueil grâce aux travaux de Xiong Chen qui a pu, grâce à la technique SCAM, vérifier la position (cytosolique, membranaire ou luminale) de plus d'une centaine de résidus de la cystinosine (données non publiées). Les résultats obtenus vont de pair avec les prédictions algorithmiques puisqu'ils prédisent l'existence de 7TMs intégraux reliés par des boucles dont la localisation est favorable à cette nouvelle pseudo-symétrie.

## 2.2 - Etude fonctionnelle

Pour le moment, deux aspects des relations entre la structure et la fonction des protéines PQ ou SWEET ont déjà été abordées : d'une part l'oligomérisation des protéines (Xuan et coll. PNAS 2013) et d'autre part le mécanisme de liaison transporteur substrat des protéines PQ (Ruivo et coll. PNAS 2011). La structure

cristalline présente un avantage certain pour éclaircir ces points mais certaines expériences, outre celles présentées dans le chapitre 2, peuvent déjà être envisagées afin de compléter les études déjà effectuées en attendant la structure.

### **2.2.1 - Oligomérisation des protéines SWEET, Frommer et coll. 2013**

Récemment, l'oligomérisation de ces transporteurs a été proposée par l'équipe de Wolf Frommer, notamment pour le transporteur de glucose de la membrane plasmique d'*Arabidopsis thaliana* AtSWEET1.

Par complémentation fonctionnelle de souches de levures déficientes pour les transporteurs plasmiques de glucose, il a été mis en évidence que (1) le transporteur sauvage AtSWEET1 permettait de restaurer la croissance de ces levures en présence de glucose dans le milieu de croissance (2) la co-expression d'une protéine AtSWEET1 non-fonctionnelle avec la protéine AtSWEET1 sauvage empêchait la croissance cellulaire.

De ces observations a été conclu que les protéines AtSWEET1 pourraient être actives sous forme d'homo-oligomères.

Afin de tester cette théorie sur la famille PQ, et de la même manière que dans l'étude citée, nous pourrions effectuer une co-expression d'un mutant non-fonctionnel de la cystinosine avec la protéine sauvage dans les ovocytes de Xénopes. Dans le cas d'un même constat que pour les protéines SWEET dans l'étude citée, nous pourrions renforcer la théorie de l'oligomérisation. De là pourrait découler d'autres expériences comme la co-expression de la cystinosine et de PQLC2, toujours à la membrane de l'ovocyte de Xénope, pour vérifier l'éventuelle translocation de nouveaux substrats dans le cas d'une hétéromérie.

## 2.3 - Etude physiopathologique

PQLC2 est un transporteur lysosomal d'arginine, substrat des Nitric Oxide Synthase (NOSs) qui catalysent la formation de monoxyde d'azote.

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule gazeuse dont la synthèse endogène est régie par trois gènes codant chacun pour un type de NOS. Deux d'entre elles sont exprimées de manières constitutives et possèdent une action dépendante du calcium, la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronale (nNOS) (Forstermann & Munzel Circulation 2006, Christopherson & Bredt, Journal of Clinical Investigation 1997). La dernière est une NOS inducible, exprimée dans les cellules de la réponse immunitaire (iNOS) (Cross et coll. JNeuroimmunol 1996).

Le rôle du NO est distinct selon le type cellulaire dans lequel il est produit. Dans les neurones, il joue un rôle dans la neurotransmission et, dans les cellules endothéliales (eNOS), dans la vasodilatation. Enfin dans les macrophages, il participe à la défense immunitaire grâce à son pouvoir cytotoxique à forte concentration.

On constate que dans certaines pathologies (Alzheimer, Parkinson, ischémie cérébrale) existe une surproduction de NO qui, au niveau des neurones, entraîne une excitotoxicité (Fehsel ClinExpImmunol 1998; Alderton BiochemJ 2001; Hunot et coll. Neuroscience 1996; Dawson & Dawson JChemNeuroanatomy 1996).

L'ischémie cérébrale est une absence d'apport, à court ou long terme, en oxygène aux cellules due à une réduction brutale de la pression sanguine. Cette

pathologie peut engendrer une nécrose partielle du cerveau pouvant, dans les cas les plus graves, entraîner la mort des individus touchés.

Dans cette pathologie a été montré l'effet contradictoire de la surproduction de NO dans sa symptomatologie précoce (Min et coll. BrainRes 2002). D'une part, le NO produit par les eNOS a un effet vasodilatatoire des microvaisseaux et des vaisseaux collatéraux qui favorisent l'afflux sanguin et donc l'apport en oxygène. D'autre part, la surproduction de NO par les nNOS engendre une excitotoxicité neuronale qui accélère le processus de nécrose. L'expression de la iNOS est induite plus tardivement et poursuit le processus d'excitotoxicité.

Les eNOS semblent utiliser très majoritairement l'arginine extracellulaire pour leur catalyse (Hobbs et coll. AnnuRevPharmacolToxicol 1999).

En revanche, un récent sujet d'étude a pu établir que les pools intracellulaires d'arginine représentent une part non négligeable de l'arginine utilisée par les nNOS pour produire du NO. Ainsi le pool lysosomal d'arginine semble jouer un rôle prédominant dans la neurotoxicité de l'ischémie via son utilisation par les nNOS. PQLC2 pourrait prendre dans ce contexte une place essentielle.

Le NO est un gaz et sa production ne peut pas être directement mesurée dans les cellules. La technique d'usage est de stimuler pendant quelques heures la production de NO dans des cellules neuronales puis de transférer le surnageant sur des cellules rapportrices qui produisent du cGMP, détectable par radioimmunoessai, proportionnellement au taux de NO dans le milieu de croissance.

De telles expériences pourraient être effectuées sur des cellules neuronales préalablement traitées avec des siRNA anti PQLC2 comme nous avons pu le faire dans l'étude présentée. L'impact de PQLC2 dans la production de NO par les nNOS pourrait être ainsi estimé.

De nombreuses recherches ont été menées afin de développer un inhibiteur spécifique des nNOS pour limiter la toxicité du NO lors des ischémies cérébrales (Alderton BiochemJ. 2001, Hobbs et coll. Moncada AnnuRevPharmacolToxicol 1999). Parmi ces molécules, le 7-nitroindazole (7-NI) est admis comme le meilleur inhibiteur des NOS neuronales. A faible dose son action est très préférentiellement ciblée aux nNOS mais cette spécificité est perdue avec l'augmentation de la dose administrée. Aussi, les expérimentations animales visant à évaluer la récupération des sujets après ischémie cérébrales sévères montrent que la récupération motrice, bien qu'améliorée par le 7-NI, est loin d'être totale. Ces résultats suggèrent que l'effet du 7-NI est limité et non améliorable par l'augmentation de la dose administrée.

L'inhibition de PQLC2 pourrait potentialiser l'effet du 7-NI en privant les nNOS d'une partie de leurs substrats. Pour concevoir ce genre d'inhibiteur, la structure cristalline de PQLC2 serait un atout non négligeable. La modélisation moléculaire d'inhibiteur par drug-design permettrait d'obtenir rapidement une liste d'inhibiteurs potentiels. Dans la mesure où ces inhibiteurs auraient une structure homologue aux acides aminés basiques et que la barrière encéphalique comprend le transporteur CAT1 (Pardridge et coll. JCBloodFlowMeta 2012),

responsable de l'influx d'acides aminés basiques dans les cellules, l'avantage d'une telle molécule serait une biodisponibilité rapide probable aux cellules neuronales.

### 3 - Transporteurs lysosomaux, nouveau rôle cellulaire.

#### 3.1 - LYAAT1 dans l'activation de mTORC1

mTORC1 (mamalian target of rapamycin complex 1) est un complexe protéique qui active la croissance cellulaire (Laplane & Sabatini Cell 2012) et inhibe l'autophagie grâce à son activité kinase qui phosphoryle plusieurs voies de signalisation (Martina et coll. Autophagy 2012). Son activation est dépendante de la concentration cellulaire en nutriments (acides aminés), du stress oxydatif, des facteurs de croissance, ou bien des conditions énergétiques de la cellule (Laplane & Sabatini CurrentBiology 2009; Sengupta et coll. Molecular Cell 2010; Sarbassov & Sabatini JBiolChem 2005; Jewell & Guan NatRevMolCellBiol 2013).

La dépendance aux nutriments est encore mal comprise mais les dernières recherches sur le sujet permettent de mieux appréhender le mécanisme sous-jacent.

En effet, pour être activé, mTORC1 doit être recruté à la membrane lysosomale par un complexe composé d'un Ragulator ainsi que de protéines G de type Rag actives, et ce, de manière dépendante de la concentration cellulaire en acides aminés. (Sancak et coll. Science 2008; Sancak et coll. Cell 2010). Le Ragulator est un GEF, pour Guanosine Exchange Factor, qui favorise l'activation des petites GTPases (Bar-Peled et coll. Cell 2012). Il a été montré que le Ragulator interagirait

physiquement avec la V-ATPase du lysosome ainsi qu'avec les protéines Rag (Zhang et coll. Cell Metab. 2014).

Les Rag font partie de la grande famille des petites GTPases Ras (ou petites protéines G Ras). De récentes études prouvent qu'ils sont les senseurs des AA dans le processus de recrutement lysosomal de mTORC1 mais ne proposent pas de mécanisme sous-jacent (Sancak et coll. Science 2008). D'autre part, une étude a montré que ces Rag interagissent directement avec le transporteur lysosomal LYAAT1 et que l'activation de mTOR est dépendante de la présence du transporteur (Ögmundsdóttir et coll. PLoS One 2012).

LYAAT1 est un transporteur lysosomal qui assure l'efflux des acides aminés neutres et dont la caractérisation a été faite dans notre laboratoire (Sagné et coll. PNAS 2001). Son action est dépendante du gradient de proton lysosomal car il co-transporte un proton à chaque cycle de transport.

LYAAT1 pourrait être le moteur du recrutement de mTOR à la membrane lysosomale dans la mesure où son activité entraînerait un microenvironnement favorable à l'activation des Rag.

Ce sujet est toutefois controversé. Certains auteurs montrent qu'une surexpression de LYAAT1 entraîne une inactivation de mTORC1 (Zoncu et coll. Science 2011). Les auteurs soumettent l'idée qu'ils s'attendaient à un résultat inverse avec une augmentation du recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale corrélée à l'augmentation du nombre de LYAAT1 à la membrane lysosomale.



### 3.2 - PQLC2 dans le taux d'AMPc cellulaire

PQLC2 semble aussi lié à la signalisation intracellulaire dans une publication coréenne qui présente cependant quelques inexactitudes.

Dans cette étude menée sur Stm1, orthologue de PQLC2 chez la levure *S.pombe*, les chercheurs parlent de Stm1 comme d'une protéine de la membrane plasmique de la levure. Ils appuient cela d'une part grâce à un Western Blot positif sur la fraction membranaire des levures mais ne distinguent pas le type de membrane (Chung et coll. *JBiolChem* 2001). Leur deuxième argument est l'observation, en microscopie à épifluorescence, de la localisation de la protéine recombinante Stm1 fusionnée à la GFP (figure 60).

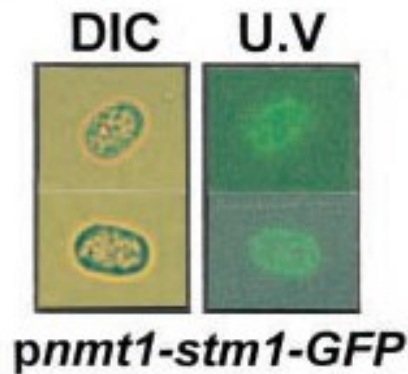


Figure 61. In situ localization of Stm1 protein. A wild type strain ED665 was transformed with plasmid pnmt1-stm1-GFP (KS1). The transformants were grown initially in the presence of thiamine (50µM) and were then transferred to medium containing 25 nM thiamine and incubated for 36 h. The picture was taken using a fluorescent microscope (Carl Zeiss). (Chung et coll. *JBC* 2001)

La localisation à la membrane plasmique n'est pas flagrante et des puncta intracellulaires apparaissent dans les deux acquisitions. Ceci et l'absence de discrimination membranaire lors du Western Blot laisse planer un doute sur la fiabilité de l'analyse.

Cependant, les différents résultats de cette étude ont pu dégager d'intéressantes informations concernant Stm1.

D'abord, un résultat très proche de notre étude est l'augmentation de l'expression de Stm1 lorsque le milieu de croissance de *S.pombe* est pauvre en source azotée. Chez *S.cerevisiae*, nous avons pu voir une augmentation de l'expression de YPQ3 lorsque le milieu de croissance était pauvre en arginine.

Deux autres résultats concernent les voies de signalisation cellulaires.

Les chercheurs ont pu constater que la surexpression de Stm1 chez *S.pombe* entraînait une baisse radicale du taux d'AMPc. De là, les chercheurs ont voulu connaître la relation qui pouvait exister entre Stm1 et une protéine liée à la régulation de l'AMPc, Gpa2.

Gpa2 est une GTPase (ou protéine G) connue pour être activée par Gprc1, un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) situé dans la membrane plasmique des cellules et stimulé par le glucose extracellulaire (Kraakman et coll. *MolMicrobiol* 1999; Colombo et coll. *EMBO J* 1998; Isshiki *GenesDev* 1992). Son activation sous forme liée au GTP permet de réguler positivement l'adénylate cyclase (Ogihara *JMedSci* 2004), enzyme responsable de la production d'AMPc dans les cellules. La conséquence principale d'un taux cellulaire important en AMPc est l'activation de la voie PKA

(protéine kinase A) qui a, entre autre, un rôle inhibiteur sur l'autophagie (Thevelein et coll. *EnzMicTech* 2000, Stephan *PNAS* 2009).

Les auteurs de cette étude ont donc cherché à savoir s'il existait une interaction entre Stm1 et Gpa2 en double hybride. Grâce à cette technique, ils ont pu montrer effectivement l'existence d'une proximité spatiale entre Stm1 et Gpa2, et ce, dans des conditions de croissance normale.

De plus, ils ont pu mettre en évidence, deux résidus de Stm1 qui, une fois mutés, n'induisent pas la baisse du taux d'AMPc attendue lors de sa surexpression. Ces deux résidus sont donc probablement nécessaires au recrutement ou bien à l'activation de la protéine Gpa2. De manière intéressante, l'un de ces résidus fait partie du motif PQ, encore inconnu au moment de l'étude.

Il s'agit de la lysine (K) assez bien conservée (figure 62) et située dans le deuxième domaine PQ, en [+9] relativement à la proline du PQ comme l'indique kster

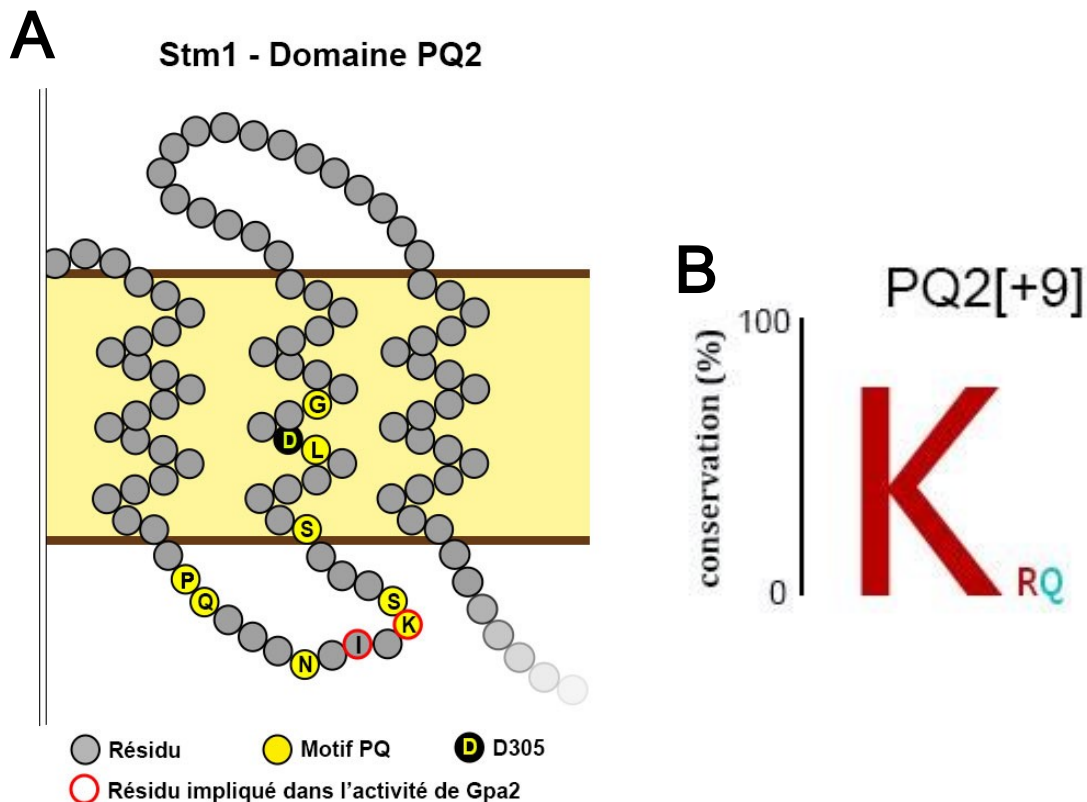


Figure 62. **A)** - Résidus impliqués dans la modulation du taux d'AMPc après surexpression de la protéine Stm1, orthologue de PQLC2, selon la publication de Chung et coll. 2001. Les résidus du motif consensus PQ sont représentés en fond jaune, le D305 en noir et les résidus d'intérêts sont entourés en rouge. **B)** Conservation du résidu lysine [+9] impliquées dans la modulation du taux d'AMPc lors de la surexpression de Stm1 dans les levures *S.pombe*. La taille des caractères correspond à la proportion de l'acide aminé dans un échantillon de 172 espèces. Les acides aminés chargés positivement sont représentés en rouge et les acides aminés polaires en bleu.

L'implication d'un résidu du motif PQ dans une interaction protéique donne une piste quant au rôle de ce motif dans cette famille PQ.

A titre informatif, les auteurs de cette étude ont proposé un motif consensus commun à Stm1 et aux RCPG pouvant être responsable de la liaison avec Gpa2. Cependant, une grosse incohérence y figure.

GPR1-3	KRIKAQIG	284
GPR1-5	KKRRAQIQ	617
STE2	RSRRF-LG	237
STE3	KKRKD-VR	191
MAM2	LIRKK-IG	240
MAP3	RRQRE-LQ	190
STM1	<sup>202</sup> KHNKI-IQ	196
	* *	
	KK K IG	
consensus	R L	
	RR R VQ	

Figure 63. Consensus sequences required for interaction with G proteins from several G protein-coupled receptors. STE2 and STE3 are the pheromone binding receptors of *S. cerevisiae*, and Mam2 and Map3 are the pheromone binding receptors of *S. pombe*. GPR1 is the recently cloned GPA2 associated protein found in *S. cerevisiae*. Stm1 possesses the consensus sequences between residues 197 and 202 in the D3 domain of the third cytoplasmic loop. (Chung et coll. JBC 2001)

En effet, la protéine Stm1 est représentée en sens inverse par rapport aux RCPG. Le pas d'hélice des deux séquences sont nécessairement en sens inverse ce qui leur confère une structure tridimensionnelle tout à fait distinctes.

Malgré ces quelques surinterprétations, les résultats obtenus suggèrent encore un lien étroit entre transporteur lysosomal et GTPase.

Les transporteurs lysosomaux pourraient donc avoir un tout nouveau rôle dans les cellules eucaryotes. Leurs activités pourraient créer des microenvironnements favorables à la croissance cellulaire via l'activation de GTPase sentinelles à la surface du lysosome.

#### 4 - Souris KO pour PQLC2

Le développement de souris KO pour PQLC2 permettrait d'aboutir, par analyse comparée du profil symptomatologique cellulaire de ces souris avec celui de maladies orphelines, à l'identification d'une nouvelle maladie lysosomale, ouvrant ainsi un nouveau champ d'étude pour le traitement de la pathologie.

Aussi, les souris KO pour PQLC2 représentent un modèle d'étude de choix pour les points abordés précédemment.

Le contenu des cellules déficientes pour PQLC2 est une donnée pouvant aussi informer sur les éventuelles implications de la protéine dans différents processus tels que la production de NO par les différentes NOSs, les signalisations dépendantes de l'AMPc ou bien l'activation de la croissance cellulaire par mTOR.

Ces souris KO informeraient aussi sur l'incidence générale de PQLC2 dans la clairance lysosomale des acides aminés basiques et sur les mécanismes compensatoires qui existent en son absence.

#### 5 - Implication de PQLC2 dans le traitement de la cystinose

La caractérisation de PQLC2 permet de comprendre le mécanisme du traitement de la cystinose par la cystéamine. Ce transporteur lysosomal est la voie d'échappement du produit de la réaction entre cystine accumulée et cystéamine absorbée. Cette avancée ouvre plusieurs pistes visant à améliorer le traitement.

## 5.1 - Réduction de la posologie: Voie des nanoparticules

L'absence de ciblage spécifique aux lysosomes est la principale raison de la dose quotidienne importante de cystéamine indiquée à 1,95 g/m<sup>2</sup>/jour dans le traitement de la cystinose. La cystéamine, principe actif du traitement contre la cystinose, est une molécule qui peut avoir des effets secondaires lorsqu'elle est ingérée en grande quantité. La molécule est toxique selon deux processus: la création de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mais aussi l'inhibition de la glutathion peroxydase (Jeitner & Lawrence Toxicol. Sci. 2001). Une étude constate que sur six patients cystinotiques, la totalité présente des lésions vasculaires ainsi que d'autres symptômes tels que des douleurs osseuses et musculaires (2/6), des symptômes neurologiques (1/6) ou bien des problèmes de peau (2/6) (Besouw et coll. JPediatr 2011).

Une piste pouvant être suivie afin de modifier la posologie du traitement est la conception de nanoparticules dissociable à bas pH. Les nanoparticules sont formées de deux constituants: d'une part un manteau de polymères hydrophobes non toxiques qui passe les membranes biologiques et d'autre part le principe actif, souvent soluble, confiné dans le manteau. La liaison entre ces deux entités peut être conçue de manière à être rompue seulement à pH acide (Miramoth et coll. ACSNano 2012). Ainsi la libération du principe actif peut être ciblée aux lysosomes.

La conception de nanoparticules ayant comme principe actif la cystéamine peut donc être une solution pour cibler sa libération. La réaction chimique liant la cystéamine au manteau de polymère est une étape assez bien maîtrisée par les chimistes. Néanmoins la structure tridimensionnelle que prend la nanoparticule

n'est, pour des raisons obscures, pas toujours celle escomptée. Celle-ci est dépendante de propriétés relatives au principe actif qui ne sont pas connues.

Dans le cas où la conception de nanoparticules de cystéamine serait un échec, il faudrait étendre la gamme de principes actifs, vraisemblablement des dérivés de cystéamine, pour tenter de les inclure dans des polymères.

Pour cela, l'identification de plusieurs molécules pouvant réagir avec la cystine et dont le produit de réaction peut s'échapper par PQLC2 permettrait d'augmenter la possibilité de succès de cette approche.

## 5.2 - Optimisation de l'effet: Régulation de PQLC2.

Nous avons pu voir dans notre étude que PQLC2 est limitant pour l'efflux lysosomal du disulfure mixte dans les cellules de patients cystinotiques.

Dans des conditions d'accumulation importante de la cystine dans les lysosomes, l'activité de PQLC2 ne serait alors pas suffisante pour évacuer le disulfure mixte, ce qui entraînerait son accumulation.

La documentation sur les effets du disulfure mixte sur les cellules est inexistante mais l'accumulation d'une molécule exogène au sein d'une cellule n'est jamais vraiment bénéfique.

Une solution pouvant empêcher ce genre de situation serait d'optimiser l'efflux du disulfure mixte en augmentant artificiellement l'activité de PQLC2.



PQLC2 est une protéine dont la régulation n'est pas encore définie. Les seules données qui existent sont celles qui décrivent chez les levures une augmentation de l'expression du transporteur dans des conditions de croissance pauvres en lysine/sources azotées (Jézégou, A. et coll. PNAS 2012, Chung et coll. JBiolChem 2001). De simples expériences pourraient être entreprises afin de savoir s'il existe une équivalence chez les cellules de mammifères.

En effectuant une RT-PCR quantitative des ARNm de PQLC2 sur des cellules de mammifères, on pourrait vérifier l'effet de l'absence d'acides aminés basiques dans le milieu de croissance sur l'expression de PQLC2. Dans le cas d'une augmentation de son expression, les patients cystinotiques pourraient suivre des régimes alimentaires visant à augmenter l'expression de PQLC2 et optimiser l'efflux du disulfure mixte.

En conclusion, la caractérisation du transporteur lysosomal des acides aminés basiques nous a permis de mettre en lumière le mécanisme du traitement de la cystinose et ouvre plusieurs champs d'études tant sur le plan fondamental qu'appliqué.

# Matériels et Méthodes

## Réactifs:

L-[2,3,4-<sup>3</sup>H]arginine (58 Ci/mmol), L-[4,5-<sup>3</sup>H(N)]lysine (105.4 Ci/mmol), et L-[2,5-<sup>3</sup>H]histidine (50.4Ci/mmol) ont été commandés chez Perkin–Elmer. Le [<sup>3</sup>H]LysOMe-dihydrochloride (0.7 Ci/mmol; 98.2% de pureté radiochimique) a été obtenu par synthèse chez Moravek Biochemicals. Le (2R)-2-amino-3-[(2-aminoethyl) disulfanyl]propanoic acid (i.e., cysteamine-cysteine MxD; 99% de pureté) et le  $\alpha$ -N-methyl-L-arginine (>96.7% de pureté) ont été obtenus par synthèse de chez IdealP Pharma et Tocris Bioscience, respectivement. Tous les autres produits chimiques sont des produits commerciaux hautement purifiés.

## Construction des ADNc:

L'ADNc de PQLC2 de rat a été amplifié par PCR depuis un clone commercial (IRAKp961M02336Q; Imagenes). L'amorce sens (5'-TGAAAGCTTGCCACCATGGTCTGGAGGACACTG-3') a permis l'inclusion d'une séquence Kozak optimisée.

Les amorces anti-sens sont 5'-AATCCGCGGGCTTGGGAGGAGCGGCTC-3' et 5'-GGCCCGCGGGCTTGGGGCGGCCGGCTCTCGCTCTGAGGC-3' pour la construction sauvage et délocalisée à la membrane plasmique (LL/AA) respectivement. Les produits de PCR ont été enzymatiquement clivés par HindIII et SacII, puis sous-clonés dans un vecteur pEGFP-N1, modifié (Clontech) par le remplacement de la méthionine d'initiation par une valine (pEGFP-N1mod). Les ADNc obtenus ont été sous-cloné directement dans le vecteur pOX(+) , par l'intermédiaire de leur restriction aux sites SacI et NotI, pour l'expression dans les ovocytes de Xénope.

Le plasmide d'expression de CAT-1 humain nous a été gracieusement offert par Ellen Closs (Mainz, Allemagne). Les ARNc cappés ont été synthétisés à partir d'un plasmide linéarisé par utilisation du kit mMessage-mMachine SP6 (Ambion) .

## Expression dans les ovocytes de Xénopes et analyse du transport:

Les ovocytes ont été préparés puis injectés avec 50ng d'ARNc de PQLC2-EGFP PQLC2-LL/AA, ou EGFP. Après un ou deux jours, les ovocytes avec la plus grande expression ont été sélectionnés sous un microscope à épifluorescence et utilisés pour le transport.

L'analyse du flux de radiotraceurs a été réalisée dans un milieu d'incubation contenant 100mM NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, et 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, tamponnée avec 5 mM d'Hepès, de MES, ou de Bis-Tris propane et ajusté au pH voulu avec du NaOH ou bien du CsOH (solution de ND100).

Les ovocytes ont été testés par groupes de cinq pour chaque condition et ont été incubés dans le ND100 avec 0,5 µCi de [3H]Arg, de [3H]Lys, ou de [3H]His, et avec 100µM (sauf indication contraire dans le texte) du même composé non radioactif. Le temps d'incubation a été fixé à 20minutes, à l'exception des tests cinétiques à 10minutes pour garder la linéarité de transport à forte concentration en substrat.

Le transport a été stoppé à l'aide de deux rinçages de ND100 pH7 glacé. La radioactivité a été comptée individuellement pour chaque ovocyte après lyse cellulaire dans 0,1 mM de NaOH, grâce à un analyseur de scintillation Tri-Carb 20100 TR (Packard).

Les courants stationnaires ont été enregistrés en voltage clamp à deux-électrodes grâce à l'OpusXpress 6000A (Molecular Devices) et analysés hors ligne avec le logiciel Clampfit10 (Molecular Devices).

#### **Expression et analyse dans les cellules de mammifères:**

Les cellules HeLa ont été électroporées avec le plasmide PQLC2 et analysées après 48h par immunofluorescence. LAMP1 a été détecté grâce à l'anticorps monoclonal H4A3 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Ames, IA) à 0,75 mg/mL. Les micrographies en épifluorescence ont été obtenues à un objectif 100x avec Nikon Eclipse TE-2000 équipé d'une caméra CCD (Coolsnap).

Les cellules HEK ont été transfectées par lipofection.

#### **RT-PCR quantitative:**

Les souris femelles C57Bl6 de 5 à 8 mois ont été tuées par dislocation cervicale. Les tissus ont été immédiatement prélevés et utilisés pour l'extraction d'ARN et la reverse transcriptase par utilisation de kits RNeasy Mini et QuantiTect (Qiagen), respectivement.

La PCR en temps réel a été réalisée avec les amorces Mm\_Pqlc2\_1\_SG et Mm\_Gapdh\_3\_SG (Qiagen), par une détection SYBR Green, sur un 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Les conditions thermiques des cycles ont été 95°C pour 5 min suivies de 40 cycles à 94°C pendant 15s, puis 55°C pendant 30s et 72°C pendant 30s.

Les niveaux d'expression ont été quantifiés par méthode comparative du cycle seuil (CT) et exprimés sous forme  $2^{-\Delta CT}$ , où  $\Delta CT = CT_{PQCL2} - CT_{GAPDH}$ .

Pour l'expérience des siRNA sur fibroblastes humains, la PCR en temps réel a été réalisée avec les amorces Hs\_PQLC2\_1\_SG et Hs\_GAPDH\_2\_SG (Qiagen) et les niveaux d'ARNm ont été quantifiés par utilisation d'une courbe standard et du logiciel Sequence Detection Systems (Applied Biosystems).

#### **Extinction de gène:**

Les fibroblastes humains et cystinotiques ont été cultivés à 37°C dans 5% de CO<sub>2</sub>. Dans un milieu MEM supplémenté avec 10% de sérum fœtal de bovin. Les cellules cystinotiques dérivent d'un patient hétérozygote présentant une mutation faux-sens (G339R) et un site muté (564+ 1G > A) dans le gène CTNS.

Les cellules ont été transfectées tous les deux à trois jours, deux à trois fois, avec 25mM. Du réactif "ON-TARGETplus" numéro J-020760-18 (5'-GGCAGGAAGUCAUUGGCUU; Dharmacon) ou du no. J-020760-19 (5'-CCAUCAACUCCGUGCUGUU;Dharmacon) ou, pour le contrôle négatif, d'un siRNA ciblé contre la luciférase (EurofinMWG Operon) à l'aide de DharmaFECT-1 (Dharmacon) .

Pour s'affranchir du lent turnover de la protéine PQCL2, les cellules ont été cultivées à une densité autorisant leur croissance (3 à 5 divisions cellulaires) pendant le traitement aux siRNA

#### **Traitement des cellules par la cystéamine:**

Deux à trois jours après la dernière transfection aux siRNA, les cellules ont été rincées avec une solution "Earle balanced salt" (EBSS) et incubée pendant 2h à 37°C dans 5% de CO<sub>2</sub> avec ou sans cystéamine (30µM-1mM) dans l'EBSS. Les cellules ont été rincées dans le PBS, détachées avec de la trypsine et centrifugées à 1,000 × g pendant 5min. Le culot cellulaire a été ensuite nettoyé avec du PBS, resuspendu dans 75µL de 5,2 N-ethylmaleimide et déprotoné par addition de 25µL d'une solution d'acide sulfosalicylique (12%).



# Références

## A-Ch

- Abramson, J. *et al.* Structure and mechanism of the lactose permease of Escherichia coli. *Science* **301**, 610–5 (2003).
- Alderton, W. K. *et al.* Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593–615 (2001).
- Anand, M. *et al.* Requirement of the Lec35 gene for all known classes of monosaccharide-P-dolichol-dependent glycosyltransferase reactions in mammals. *Mol. Biol. Cell* **12**, 487–501 (2001).
- Besouw, M. T. *et al.* Cysteamine toxicity in patients with cystinosis. *J. Pediatr* **159**, 1004–1011 (2011). Bonifacino, J. S. & Glick, B. S. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* **116**, 153–166 (2004).
- Butler DeB., J. & Zatz, M. Pantethine and cystamine deplete cystine from cystinotic fibroblasts via efflux of cysteamine-cysteine mixed disulfide. *J. Clin. Invest.* **74**, 411–416 (1984).
- Chapel, A. *et al.* An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 1572–88 (2013).
- Chen, Y.-J. *et al.* X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18999–19004 (2007).
- Chen, L.-Q. *et al.* Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527–532 (2010).
- Cherqui, S., Kalatzis, V., Trugnan, G. & Antignac, C. The Targeting of Cystinosin to the Lysosomal Membrane Requires a Tyrosine-based Signal and a Novel Sorting Motif. *J. Biol. Chem.* **276**, 13314–13321 (2001).
- Christopherson, K. S. & Bredt, D. S. Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *Journal of Clinical Investigation* **100**, 2424–2429 (1997).
- Chung, K. S. *et al.* Isolation of a Novel Gene from Schizosaccharomyces pombe: Stm1 Encoding a Seven-transmembrane Loop Protein that May Couple with the Heterotrimeric Gα2 Protein, Gpa2. *J. Biol. Chem.* **276**, 40190–40201 (2001).

## Co – Ga

- Colombo, S. *et al.* Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**, 3326–3341 (1998).
- Costa, A. *et al.* The Arabidopsis central vacuole as an expression system for intracellular transporters: functional characterization of the Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger CLC-7. *J. Physiol.* **590**, 3421–30 (2012).
- Cross, A. H. *et al.* Inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity correlate with disease activity in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **71**, 145–53. (1996).
- Cserző, M., Bernassau, J. M., Simon, I. & Maigret, B. New alignment strategy for transmembrane proteins. *J. Mol. Biol.* **243**, 388–396 (1994).
- Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Nitric oxide neurotoxicity. in *Journal of Chemical Neuroanatomy* **10**, 179–190 (1996).
- DeChancie, J., Shrivastava, I. H. & Bahar, I. The mechanism of substrate release by the aspartate transporter GltPh: insights from simulations. *Mol. Biosyst.* **7**, 832–842 (2011).
- Dubyak, G. R. Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Adv. Physiol. Educ.* **28**, 143–154 (2004).
- Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T. & Mackinnon, R. X-ray structure of a ClC chloride channel  $\hat{E}$  reveals the molecular basis of at 3 . 0 Å anion selectivity. **415**, 287–294 (2002).
- Eicher, T. *et al.* Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *eLife* **3**: e031445 (2014)
- Fehsel, K. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. 147–156 (1998).
- Forrest, L. R., Kramer, R. & Ziegler, C. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1807**, 167–188 (2011).
- Forrest, L. R. *et al.* Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10338–10343 (2008).
- Forstermann, U. & Munzel, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation* **113**, 1708–1714 (2006).
- Gadsby, D. C. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 344–352 (2009).
- Gahl, W. A., Thoene, J. G. & Schneider, J. A. Cystinosis. *N. Engl. J. Med.* **347**, 111–121 (2002).
- Gahl, W. A., Bashan, N., Tietze, F., Bernardini, I. & Schulman, J. D. Cystine transport is defective in isolated leukocyte lysosomes from patients with cystinosis. *Science* **217**, 1263–1265 (1982).

## Ga – Ko

- Gao, X. D., Wang, J., Keppler-Ross, S. & Dean, N. ERS1 encodes a functional homologue of the human lysosomal cystine transporter. *FEBS J.* **272**, 2497–2511 (2005).
- Hayashi, K., Jutabha, P., Endou, H., Sagara, H. & Anzai, N. LAT1 is a critical transporter of essential amino acids for immune reactions in activated human T cells. *J. Immunol.* **191**, 4080–5 (2013).
- Hill, K. *et al.* Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* **395**, 516–521 (1998).
- Hobbs, a, Higgs, a & Moncada, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **39**, 191–220 (1999).
- Huang, Y., Lemieux, M. J., Song, J., Auer, M. & Wang, D.-N. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli. *Science* **301**, 616–20 (2003).
- Hunot, S. *et al.* Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* **72**, 355–363 (1996).
- Isshiki, T., Mochizuki, N., Maeda, T. & Yamamoto, M. Characterization of a fission yeast gene, gpa2, that encodes a Ga subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes Dev.* **6**, 2455–2462 (1992).
- Jayaram, H., Accardi, A., Wu, F., Williams, C. & Miller, C. Ion permeation through a Cl<sup>-</sup>-selective channel designed from a CLC Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11194–11199 (2008).
- Jeitner, T. M. & Lawrence, D. A. Mechanisms for the cytotoxicity of cysteamine. *Toxicol. Sci.* **63**, 57–64 (2001).
- Jewell, J. L., Russell, R. C. & Guan, K.-L. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 133–9 (2013). Chen, Y. & Klionsky, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* **124**, 161–170 (2011).
- Jézégou, A. *et al.* Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E3434–43 (2012).
- Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C. & Gasnier, B. Cystinosis, the protein defective in cystinosis, is a H<sup>+</sup>-driven lysosomal cystine transporter. *EMBO J.* **20**, 5940–5949 (2001).
- Kalatzis, V., Nevo, N., Cherqui, S., Gasnier, B. & Antignac, C. Molecular pathogenesis of cystinosis: Effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosis. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1361–1371 (2004).
- Kalatzis, V. *et al.* Characterization of a putative founder mutation that accounts for the high incidence of cystinosis in Brittany. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2170–2174 (2001). Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R. & Sabatini, D. M. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* **150**, 1196–1208 (2012).



## Ka – Mo

- Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world. *Trends in Cell Biology* **22**, 407–417 (2012).
- Korkhov, V. M. & Tate, C. G. An emerging consensus for the structure of EmrE. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **65**, 186–192 (2009).
- Kraakman, L. *et al.* A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* **32**, 1002–1012 (1999).
- Kunji, E. R. S. & Crichton, P. G. Mitochondrial carriers function as monomers. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1797**, 817–831 (2010).
- Lapante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293 (2012).
- Lapante, M. & Sabatini, D. M. An Emerging Role of mTOR in Lipid Biosynthesis. *Current Biology* **19**, (2009).
- Lentes, C. J. *et al.* Molecular characterization of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter NhaA from *Salmonella Typhimurium*. *PLoS One* **9**, (2014).
- Leto, D. & Saltiel, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 383–396 (2012).
- Lloris-Garcerá, P. *et al.* In vivo trp scanning of the small multidrug resistance protein EmrE confirms 3D structure models'. *J. Mol. Biol.* **425**, 4642–4651 (2013).
- Lu, Y. *et al.* Overexpression of Arginine Transporter CAT-1 Is Associated with Accumulation of L-Arginine and Cell Growth in Human Colorectal Cancer Tissue. *PLoS One* **8**, e73866 (2013).
- Marko, A. J., Miller, R. A., Kelman, A. & Frauwirth, K. A. Induction of glucose metabolism in stimulated T lymphocytes is regulated by mitogen-activated protein kinase signaling. *PLoS One* **5**, (2010).
- Martina, J. A., Chen, Y., Gucek, M. & Puertollano, R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**, 903–914 (2012).
- Miller, C. & Nguiragool, W. A provisional transport mechanism for a chloride channel-type Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **364**, 175–180 (2009).
- Min, H. J., Kaku, T., Hada, J. & Hayashi, Y. Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. *Brain Res.* **946**, 139–147 (2002).
- Mindell, J. a. Lysosomal acidification mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 69–86 (2012).
- Morin, P., Sagne, C. & Gasnier, B. Functional characterization of wild-type and mutant human sialin. *Embo J.* **23**, 4560–4570 (2004).

## Ne – Sa

- Neagoe, I., Stauber, T., Fidzinski, P., Bergsdorf, E. Y. & Jentsch, T. J. The late endosomal CIC-6 mediates proton/chloride countertransport in heterologous plasma membrane expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 21689–21697 (2010).
- Nesterova, G. & Gahl, W. a. Cystinosis: The evolution of a treatable disease. *Pediatr. Nephrol.* **28**, 51–59 (2013).
- Ogihara, H. *et al.* Direct activation of fission yeast adenylyl cyclase by heterotrimeric G protein gpa2. *Kobe J. Med. Sci.* **50**, 111–121 (2004).
- Ögmundsdóttir, M. H. *et al.* Proton-assisted Amino acid transporter PAT1 complexes with Rag GTPases and activates TORC1 on late endosomal and lysosomal membranes. *PLoS One* **7**, e36616 (2012).
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1–34 (1998).
- Pardridge, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier. *J. Cereb. blood flow Metab.* **32**, 1959–1972 (2012).
- Pebay-Peyroula, E. *et al.* Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* **426**, 39–44 (2003).
- Pisoni, R. L., Thoene, J. G. & Christensen, H. N. Detection and characterization of carrier-mediated cationic amino acid transport in lysosomes of normal and cystinotic human fibroblasts. Role in therapeutic cystine removal. *J. Biol. Chem.* **260**, 4791–4698 (1985).
- Pisoni, R. L., Thoene, J. G., Lemons, R. M. & Christensen, H. N. Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system y<sup>+</sup> of the human fibroblast. *J. Biol. Chem.* **262**, 15011–15018 (1987).
- Ponting, C. P., Mott, R., Bork, P. & Copley, R. R. Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution. *Genome Res.* **11**, 1996–2008 (2001).
- Robinson, A. J., Overy, C. & Kunji, E. R. S. The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17766–17771 (2008).
- Ruivo, R. *et al.* Mechanism of proton/substrate coupling in the heptahelical lysosomal transporter cystinosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E210–E217 (2012).
- Sagné, C. *et al.* Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7206–7211 (2001).
- Sancak, Y. *et al.* Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290–303 (2010).
- Sancak, Y. *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**, 1496–1501 (2008).

## Sa –Wa

- Sarbassov, D. D. & Sabatini, D. M. Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J. Biol. Chem.* **280**, 39505–39509 (2005).
- Saudek, V. Cystinosin, MPDU1, SWEETs and KDELR belong to a well-defined protein family with putative function of cargo receptors involved in vesicle trafficking. *PLoS One* **7**, e30876 (2012).
- Schushan, M. *et al.* A model-structure of a periplasm-facing state of the NhaA antiporter suggests the molecular underpinnings of pH-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* **287**, 18249–18261 (2012).
- Schröder, B. A., Wrocklage, C., Hasilik, A. & Saftig, P. The proteome of lysosomes. *Proteomics* **10**, 4053–4076 (2010).
- Seeger, M. a *et al.* Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* **313**, 1295–1298 (2006).
- Sémiramoth, N. S. *et al.* Self-assembled squalenoylated penicillin bioconjugates: An original approach for the treatment of intracellular infections. *ACS Nano* **6**, 3820–3831 (2012).
- Sengupta, S., Peterson, T. R. & Sabatini, D. M. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Molecular Cell* **40**, 310–322 (2010).
- Shi, Y. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 51–72 (2013).
- Shimazu, M., Sekito, T., Akiyama, K., Ohsumi, Y. & Kakinuma, Y. A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 4851–4857 (2005).
- Snabaitis, A. K., Cuello, F. & Avkiran, M. Protein kinase B/Akt phosphorylates and inhibits the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger NHE1. *Circ. Res.* **103**, 881–890 (2008).
- Stephan, J. S., Yeh, Y.-Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J. & Herman, P. K. The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17049–17054 (2009).
- Thevelein, J. M. *et al.* Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 819–825 (2000).
- Town, M. *et al.* A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat. Genet.* **18**, 319–324 (1998).
- Ware, F. E. & Lehrman, M. a. Expression cloning of a novel suppressor of the Lec15 and Lec35 glycosylation mutations of Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 13935–13938 (1996).

## Xu – Zo

- Xuan, Y. H. *et al.* Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E3685–94 (2013).
- Yan, N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 151–159 (2013).
- Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y. & Gouaux, E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* **431**, 811–818 (2004).
- Yu, L. *et al.* Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* **465**, 942–946 (2010).
- Zhai, Y., Heijne, W. H. M., Smith, D. W. & Saier, M. H. Homologues of archaeal rhodopsins in plants, animals and fungi: Structural and functional predications for a putative fungal chaperone protein. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1511**, 206–223 (2001).
- Zhang, C.-S. *et al.* The Lysosomal v-ATPase-Ragulator Complex Is a Common Activator for AMPK and mTORC1, Acting as a Switch between Catabolism and Anabolism. *Cell Metab.* 1–15 (2014).
- Zoncu, R. *et al.* mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Science (80-. ).* **334**, 678–683 (2011).



## Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer le travail que j'ai pu effectuer lors de mon doctorat. Merci au Pr. Marc le Maire d'avoir accepté de présider ma soutenance. Merci au Dr. Bruno Miroux ainsi qu'au Dr. Roland Salesse d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit dans un laps de temps relativement court. Merci au Dr. Salah El Mestikawy et au Dr. Vasiliki Kalatzis d'avoir accepté d'être mes examinateurs lors de ma soutenance.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance envers mon directeur de thèse, le Dr. Bruno Gasnier pour m'avoir accueilli dans son équipe puis accompagné et encadré tout au long de mon master 2 et de ma thèse. Merci pour ta disponibilité, ta pertinence, ta confiance et ta patience.

Je tiens également à remercier sincèrement le Dr. Corinne Sagné et le Dr. Christine Anne pour le temps qu'elles ont pu m'accorder, tant dans les corrections du manuscrit que dans le partage de leur précieuse expérience et de leur savoir tout au long de mon doctorat. Merci pour vos conseils toujours avisés.

Un grand merci au Dr. Seana O'Reagan, dont le rire me fera toujours sourire, d'avoir partagé des moments intellectuels toujours intéressants sur quelque sujet que ce soit. Merci pour ton enthousiasme et ta bienveillance.

Merci à Cécile Debacker de m'avoir formé aux bonnes pratiques de laboratoire, d'avoir été disponible pour des requêtes parfois de dernière minute. Merci pour ton aide, ta réactivité et ton sens de la rigueur.

Merci au Dr. Xiong Chen d'avoir été mon compagnon nocturne pendant de nombreuses soirées au laboratoire et pour avoir fait preuve de patience pour comprendre mon anglais approximatif.

Merci au Dr. François Darchen et à l'ensemble de son équipe pour les rapports toujours positifs que nous avons pu entretenir: Merci au Dr. Claire Desnos pour ses conseils et sa gentillesse, au Dr. Isabelle Fanget pour sa franchise, à Nathanael Larochette pour son altruisme, au Dr. Asma Soltani pour sa sincérité, au Dr. Ouardane Jouannot pour ses tours de magie et au Dr. Marine Bretou pour sa sympathie.

Un merci très spécial à Christopher Ribes, qui entame une nouvelle vie de papa poule, pour avoir partagé toutes ces discussions plus abracadabrantes les unes que les autres et pour m'avoir encouragé dans les périodes délicates.

Merci à Jacqueline pour son franc-parler, son éloquence et d'avoir partagé tous ces moments de franche camaraderie. Merci à Elie Berda de m'avoir promu au rang de professeur Jézégou durant toute ma thèse. Merci à Vivianne Sébille et à Carole Sens, nos deux gestionnaires au caractère bien trempé. Merci à Xavier Leray de prendre la relève de mon travail ainsi qu'à Quentin Verdon en thèse dans le laboratoire, j'espère que vos travaux seront fructueux.

J'aimerais également remercier nos collaborateurs qui ont participé à cette belle aventure, le Dr. Bruno André et le Dr. Elisa Llinares pour leur accueil et le partage de leurs résultats dans leur laboratoire de l'Université de Bruxelles et le Dr. Agnès Journet du CEA Grenoble.

Merci au Pr. Marc le Maire et au Pr. Hervé Daniel de m'avoir donné la chance d'intégrer leur Master 2 et de m'avoir orienté avec justesse.

Je tiens à remercier particulièrement le Directeur de mon école doctorale, le Dr. Michael Schumacher pour ses encouragements, sa vision de la recherche et son engagement dans celle-ci ainsi que pour les interactions très positives que nous avons pu avoir ensemble. Merci également à Mr Surdi pour avoir su combler mes imperfections administratives.

Pour finir, je remercie chaleureusement ceux qui m'ont supporté sans condition dans cette phase de ma vie, mes précieux parents, mon cher frère, mes amis, Marie.













## Résumé

Le transport de composés à travers les membranes biologiques est crucial pour la physiologie des cellules eucaryotes. Cependant la fonction de nombreux transporteurs putatifs reste inconnue. C'est notamment le cas de nombreux transporteurs intracellulaires exportant les catabolites du lysosome. Le transporteur lysosomal de cystine, baptisé cystinosine, se caractérise par la présence d'un motif dupliqué appelé " boucle PQ ". Sa dysfonction entraîne une maladie lysosomale, la cystinose, caractérisée par l'accumulation de cystine dans les lysosomes. Les protéines possédant un motif PQ sont retrouvées plus souvent dans les cellules eucaryotes et, à l'exception de la cystinosine, leur fonction reste inconnue. Dans cette thèse, nous démontrons qu'une autre protéine à motif PQ, PQLC2 est le transporteur responsable de l'efflux lysosomal des acides aminés cationiques et qu'il est impliqué dans le traitement de la cystinose.

L'hypothèse de départ était basée, d'une part, par sur des prédictions par analyse protéomique de la localisation lysosomale de PQLC2 et, d'autre part, sur des résultats chez *S.cerevisiae* impliquant les orthologues putatifs de PQLC2, situés à la membrane de la vacuole, dans l'homéostasie des acides aminés cationiques. En utilisant une approche consistant à délocaliser PQLC2 à la membrane plasmique et à acidifier le pH extracellulaire pour mimer la lumière acide du lysosome, nous avons pu, par mesure d'accumulation intracellulaire de composés radiomarqués et par mesure électrophysiologique sur cellule entière, faire la preuve du transport sélectif, actif à bas pH et de faible affinité des acides aminés cationiques par PQLC2. Dans une seconde partie, nous avons mis en évidence l'implication de ce transporteur dans l'efflux lysosomal du produit de réaction entre la cystine accumulée dans les lysosomes de cellules de patients cystinotiques et le principe actif (cystéamine) du traitement pharmacologique de la cystinose.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons effectué une analyse bioinformatique préliminaire des protéines à motif PQ qui exploitait la pseudo-symétrie de ces protéines pour identifier des résidus potentiellement impliqués dans l'activité de transport.

## Abstract

Transport of solutes across biological membranes is crucial to eukaryotic cell physiology. However, the function of many putative transporters remains unknown, such as the proteins responsible for lysosomal export of metabolites. Cystinosin, the lysosomal cystine exporter defective in cystinosis, is characterized by a duplicated motif termed the PQ loop. PQ-loop proteins are more frequent in eukaryotes than in prokaryotes, and, except for cystinosin, their molecular function remains unknown. Here we show that another PQ-loop protein, PQLC2, is a lysosomal transporter for cationic amino acids and that it is required for the treatment of cystinosis.

The hypothesis that PQLC2 is a lysosomal metabolite transporter was based on a proteomic study predicting that PQLC2 is located at the lysosomal membrane and on a genetic study that linked putative yeast orthologues with cationic amino acid homeostasis. Using an approach that consisted in misrouting PQLC2 to the plasma membrane of frog oocytes and in acidifying the extracellular medium to mimic the acidic lysosomal lumen, we showed an accumulation of radiolabelled cationic amino acids into mRNA-injected oocytes and an electrogenic, inward current due to a selective, pH-dependent, low-affinity transport of cationic amino acids by PQLC2. Moreover, we showed that PQLC2 exports a key chemical intermediate (cysteamine-cysteine mixed disulfide) from cystinotic lysosomes treated with the aminothiols drug cysteamine, thus explaining the mechanism underlying the current drug therapy of cystinosis.

Finally, in a last chapter, we performed a preliminary bioinformatic study of the family of PQ-loop proteins that took advantage of the pseudo-symmetric structure of these proteins to identify residues potentially important for the transport activity.